

UNIVERSIDAD COMPLUTENSE DE MADRID
FACULTAD DE VETERINARIA
Departamento de Nutrición, Bromatología y Tecnología de los Alimentos



TESIS DOCTORAL

**Viabilidad tecnológica y biodisponibilidad de diferentes sales de calcio
como ingredientes funcionales en productos cárnicos**

MEMORIA PARA OPTAR AL GRADO DE DOCTOR

PRESENTADA POR

Ana María Soto Carrión

Directoras

María Dolores Selgas Cortecero
María Luisa García Sanz

Madrid, 2016

UNIVERSIDAD COMPLUTENSE DE MADRID
FACULTAD DE VETERINARIA
DEPARTAMENTO DE NUTRICIÓN, BROMATOLOGÍA
Y TECNOLOGÍA DE LOS ALIMENTOS



VIABILIDAD TECNOLÓGICA Y BIODISPONIBILIDAD DE
DIFERENTES SALES DE CALCIO COMO INGREDIENTES
FUNCIONALES EN PRODUCTOS CÁRNICOS

TESIS DOCTORAL

ANA MARÍA SOTO CARRIÓN

Directores

MARÍA DOLORES SELGAS CORTECERO

MARÍA LUISA GARCÍA SANZ

Madrid, 2015



Departamento de Nutrición, Bromatología y

Tecnología de los Alimentos

FACULTAD DE VETERINARIA

Ciudad Universitaria , s/n. 28040 Madrid

Teléfono: 91 394 3749. Fax: 91 394 37 43

M^o DOLORES SELGAS CORTECERO, Catedrático de Tecnología de los Alimentos y
M^o LUISA GARCÍA SANZ, Profesora Titular de Tecnología de los Alimentos, ambas
profesoras de este Departamento

CERTIFICAN

Que la Tesis Doctoral titulada “VIABILIDAD TECNOLÓGICA Y BIODISPONIBILIDAD DE DIFERENTES SALES DE CALCIO COMO INGREDIENTES FUNCIONALES EN PRODUCTOS CÁRNICOS”, presentada por Ana María Soto Carrión, Licenciada en Veterinaria, para optar al grado de Doctor, ha sido realizada en el Departamento de Nutrición, Bromatología y Tecnología de los Alimentos de la Facultad de Veterinaria de la Universidad Complutense de Madrid, bajo la dirección conjunta de las que suscriben y autorizan su presentación para que pueda ser juzgada por el tribunal que se nombre a tal fin.

Madrid, 30 de Octubre de 2015

Las Directoras de la Tesis Doctoral,

M^a Dolores Selgas Cortecero

M^a Luisa García Sanz



Departamento de Nutrición, Bromatología y

Tecnología de los Alimentos

FACULTAD DE VETERINARIA

Ciudad Universitaria , s/n. 28040 Madrid

Teléfono: 91 394 3749. Fax: 91 394 37 43

El trabajo experimental que ha dado lugar a esta memoria ha sido realizado en el Departamento de Nutrición, Bromatología y Tecnología de los Alimentos de la Facultad de Veterinaria de la Universidad Complutense de Madrid financiado mediante los proyectos de investigación:

- Programa CONSOLIDER-Ingenio 2010, Ref. CSD 2007-00016: "Productos cárnicos para el siglo XXI: seguros, nutritivos y saludables". Acción 4: Diseño de productos cárnicos funcionales saludables y nutritivos con especial mención a embutidos y otros productos curados (Acrónimo FUNCIOCA).
- Comisión Interministerial de Ciencia y Tecnología (CICYT). Ref. AGL2007-6366/A4: "Ingredientes funcionales en matrices cárnicas: viabilidad tecnológica, disponibilidad y efecto de la aplicación de tecnologías emergentes".
- Programa de Creación y Consolidación de Grupos de Investigación Banco Santander Central Hispano-Universidad Complutense (BSCH-UCM 920276). Ref. GR32/10A.

Agradecimientos

Este capítulo es tal vez, el más emotivo de toda la Tesis Doctoral. Escribirlo, indica haber concluido un intenso trabajo llevado a cabo en colaboración con numerosas personas. Permitidme, que os cuente una pequeña historia.

Érase una vez...

Una joven que acababa de terminar su licenciatura en Veterinaria y andaba muy perdida... Los años en la facultad fueron duros pero se encontraba con algo más difícil ante ella, incorporarse en el ¡mundo laboral!

Durante casi un año, llamé, escribí e hizo varias entrevistas, pero no tuvo éxito hasta que un día, apareció publicada una oferta para trabajar en investigación en el ¡¡Dpto. de "Tecno"!!! así que sin dudarlo, envié la solicitud.

Al poco tiempo, recibí respuesta de la Dra. M^a Dolores Selgas, que le invitó a hablar sobre el proyecto y allí que fue, un cálido día de Octubre del 2008. En ese despacho pudo conocer a la persona que se interesó en su solicitud y a su compañera, la Dra. María Luisa García, quienes la explicaron con gran esmero y sinceridad el proyecto para el cual podría formar parte. Sin dudarlo, la joven, con gran ilusión, les comentó que quería formar parte de su equipo y que se sentiría muy afortunada de investigar junto a ellas. Así fue, como esa recién licenciada se convirtió en doctorando.

A lo largo de siete años, la joven doctoranda disfrutó de la compañía del personal del Dpto. de "Tecno", aprendió a investigar y superó numerosas dificultades tanto profesionales como personales, por lo que ahora... en este punto, tan sólo puede agradecer a todos aquellos que han formado y forman parte de su vida, ya que sin ellos, no hubiera llegado al momento de defender su Tesis Doctoral.

Al final la joven terminó siendo feliz, aunque no comió perdices (porque no la gustan) agradeciendo a todos los que han estado y están junto a ella.

Gracias...

En primer lugar, a mis directoras de tesis, la Dra. M^a Dolores Selgas Cortecero y la Dra. M^a Luisa García, por la oportunidad que me han dado para poder desarrollar este trabajo, por su implicación en el mismo y por su confianza depositada en mí,

Agradecimientos

principalmente cuando no hemos podido disfrutar de una beca para la realización de esta tesis y que aún así, se ha llevado a cabo. Mi más sincera gratitud.

No puedo olvidarme del personal que compone el Centro de Apoyo a la Investigación de la Universidad Complutense de Madrid, ya que sin ellos, no podría haber obtenido mis resultados de bioaccesibilidad del Calcio, al igual que a la empresa Quimicral S.L., por su dedicación y esmero en el análisis de las muestras enviadas, así como en su trato a la hora de responder las miles de preguntas que teníamos sobre el tema.

Gracias Dra. Paloma Morales y Dra. Ana Haza por vuestra gran paciencia al explicarme todo lo relacionado con el mundo de las células. Jamás olvidaré esos buenos ratos que pasé con vosotras en el cuartito de células.

Gracias Dra. Lola Romero de Ávila, por tu amistad, por tu cariño y apoyo, principalmente en el momento más duro de mi vida. Gracias Dra. Carmen Herranz, por encontrarme a la BiChii, y que esta gatuna "psychopy" ha sido el lazo de unión de nuestra amistad. Gracias Dra. Eva Hierro por los ratos de risas que hemos pasado en la cocina. Gracias Dr. Juan Miguel Rodríguez, por acogerme en tu grupo, darme la oportunidad de trabajar en él y sacarme una sonrisa en cualquier momento (aunque me sonrojes muchas veces). Gracias Dra. Leónides Fernández por enseñarme tantas cosas, por escucharme y por ser un gran apoyo. Gracias Dra. María Marín por tus sonrisas y ánimos. Gracias a todo el equipo de Probisearch S.L. (tanto el que está en la facultad como en Tres Cantos), por haber sido mis compañeros, haberme enseñado parte del mundo de la microbiología y haber pasado tantos buenos ratos en el Lagar o en Cuba o donde fuese. Gracias Dra. Laura Moles, porque tienes un corazón que no cabe en tu pecho y me mostraste que los buenos amigos están tanto en los buenos como en los malos momentos. Gracias Dra. Isabel Cambero por preocuparte tanto por mí y haber sido el contacto de varias entrevistas. Gracias Dr. Juan Antonio Ordóñez (Billy), por tus bromas y hacer sonreír tantísimas veces. Gracias a todos los profesores como personal, tanto del área de Tecno como de Higiene, porque con vuestros saludos habéis hecho que me sintiera muy feliz de formar parte de vuestro Dpto. También quiero agradecer la ayuda y apoyo de Santiago, Andrés, Alberto y Aurora, que es como un rayo de luz en el bosque más sombrío y gracias a todos los que han sido mis compañeros (que son numerosos) que me han acompañado en esta aventura, por los buenos ratos que hemos pasado y las risas que nos hemos echado.

Agradecimientos

No obstante no puedo olvidarme de mis seres más queridos y compartir con todo aquel que esté leyendo este apartado mi gratitud hacia ellos. Gracias a mi padre, que aún con "lo que tiene encima", está ahí y hace que me sienta la persona más especial de este mundo. Mi gratitud hacia mi madre, por su amor incondicional y apoyo. Hacia mi hermano, la persona más importante de mi vida que cuando le dije "necesito que seas mi hermano de verdad" ahí estuvo, me acogió, me cuidó y me amó y a su esposa Elisa, por quererme tanto y haberme dado lo que más quiero, mis dos sobrinos Rodrigo y David. Hacia Elisa madre, por ser una persona tan especial. Hacia mi "captain" (Pon!) por mostrarme lo que significa realizar una Tesis Doctoral y acompañarme cuando mi mundo se derrumbó. Hacia Blanca, Nuria, Paula y Vanessa por el simple hecho de "estar ahí" y bien saben lo muy agradecidas que las estoy. Hacia el "team WB" por esos fantásticos momentos. Hacia mi querida Espe (Dra. Esperanza Gómez-Lucía) y Dave, gracias, mil gracias por vuestros consejos y cariño, no sabéis lo afortunada que me siento por estar a mi lado. Hacia todos mis amigos, porque conocéis bien lo que esto significa y gracias a las dos personas que más comprensión y cariño me han mostrado en esta recta final, Cristina y Leonor, que me han escuchado y me han animado a hacer realidad mis sueños, dándome una gran oportunidad en mi vida, sin ellas, ahora mismo no sería lo que soy, una veterinaria orgullosa de su profesión ¡Gracias! Mi gratitud también hacia mis "bichos", Welin, por animarme cada día que volvía de la facultad y Chii (BiChii) por sus ronroneos mientras escribía la tesis.

En último lugar, aunque no menos importante, gracias JF, gracias por haberte interesado por la "elaboración de mis salchichones", por hacerme sentir una "súper heroína" por estar realizando mi Tesis Doctoral mientras trabajaba, por escucharme, por apoyarme, por ser mi "Winston Wolfe", por formar mi "hogar" y por amarme.

Y gracias a ti, que ahora mismo estás leyendo estos sentimientos, por compartir este momento conmigo.

Tan sólo puedo finalizar citando la frase de Antonio Machado que tanto me ha motivado a lo largo de mi vida y que reza así:

“Si es bueno vivir, todavía es mejor soñar, y lo mejor de todo, despertar.”

A todos, ¡MUCHAS GRACIAS!

Dedicada a mi familia, a mi “hogar”
y a todos aquellos que me han apoyado
en los momentos más difíciles de mi vida.

Gracias

“Que la comida sea tu alimento y
el alimento tu medicina”

Hipócrates de Cos (s. V a.C - s. IV a.C.)

ÍNDICE

Índice

ÍNDICE.....	i
Listado de abreviaturas.....	v
RESUMEN	1
SUMMARY.....	7
Capítulo 1: INTRODUCCIÓN.....	11
1.1. Los minerales de los alimentos.....	15
1.1.1. Los minerales como Elementos Esenciales.....	17
1.1.2. Determinación del contenido de minerales.....	18
1.1.3. Absorción y transporte de minerales.....	19
1.1.4. Minerales y salud.....	21
1.2. Calcio: fisiología e importancia.....	27
1.2.1. Metabolismo y funciones del calcio.....	27
1.2.2. El calcio y su actividad a nivel celular.....	32
1.2.3. Ingesta de calcio recomendada.....	34
1.2.4. Déficits y excesos del calcio: riesgos para la salud.....	36
1.3. Biodisponibilidad del calcio.....	39
1.3.1. Biodisponibilidad de nutrientes.....	39
1.3.2. Métodos.....	41
1.3.3. Absorción del calcio.....	48
1.3.4. Interacciones e influencia de factores dietéticos en la absorción del calcio.....	49
1.4. Alimentos funcionales.....	51
1.4.1. Principales ingredientes funcionales.....	52
1.4.1.1. Probióticos, prebióticos y simbióticos.....	52
1.4.1.2. Vitaminas.....	54

1.4.1.3. Minerales.....	54
1.4.1.4. Fibra.....	54
1.4.1.5. Antioxidantes.....	55
1.4.1.6. Ácidos grasos n-3.....	55
1.4.2. Legislación.....	55
1.4.3. Alimentos enriquecidos en calcio.....	60
1.5. Productos cárnicos funcionales.....	63
1.5.1. Estrategias para elaborar productos cárnicos más saludables.....	64
1.5.2. Productos cárnicos enriquecidos en calcio.....	66
Capítulo 2: JUSTIFICACIÓN Y OBJETIVOS.....	71
Capítulo 3: MATERIAL Y MÉTODOS.....	75
3.1. Material.....	77
3.1.1. Material general.....	77
3.1.2. Material de planta piloto.....	78
3.1.3. Reactivos y disolventes.....	79
3.1.4. Material biológico.....	79
3.1.5. Sales.....	80
3.2. Métodos.....	81
3.2.1. Elaboración de productos cárnicos.....	81
3.2.1.1. Selección y preparación de las sales cálcicas ensayadas.....	81
3.2.1.2. Elaboración de productos cárnicos frescos: hamburguesas.....	82
3.2.1.3. Elaboración de productos cárnicos cocidos: mortadelas.....	83
3.2.1.4. Elaboración de productos cárnicos madurados: salchichones.....	86

3.3. Técnicas analíticas.....	90
3.3.1. Determinación del pH y de la actividad del agua (a_w).....	90
3.3.2. Determinación del extracto seco.....	90
3.3.3. Determinación de la capacidad de retención de agua.....	91
3.3.4. Análisis microbiológico.....	91
3.3.5. Determinación del contenido de cenizas.....	92
3.3.6. Determinación del color.....	92
3.3.7. Análisis de textura.....	93
3.3.7.1. Ensayo de doble compresión (APT).....	94
3.3.7.2. Prueba de corte.....	96
3.3.8. Análisis sensorial.....	97
3.3.8.1. Análisis Hedónico.....	99
3.3.8.2. Análisis Preferencial.....	101
3.3.8.3. Análisis Visual Descriptivo.....	103
3.3.9. Determinación del calcio.....	105
3.3.10. Bioaccesibilidad del calcio.....	105
3.3.10.1 Método de diálisis.....	106
3.3.10.2 Línea celular Caco-2.....	107
3.3.11. Análisis estadístico.....	113
Capítulo 4: TRABAJO EXPERIMENTAL.....	115
4.1. Technological and sensory properties of hamburgers with calcium. Study of the <i>in vitro</i> bioavailability.....	119
4.2. Sodium chloride influence on the technological and sensory properties of hamburgers patties enriched with calcium.....	131
4.3. Calcium bioaccesability and technological properties of enriched cooked sausages.....	153
4.4. Technological and sensory properties of calcium enriched	

Índice

dry fermented sausages. Study of the calcium bioavailability.....	187
4.5. Bioavailability of calcium from enriched meat products using Caco-2 cells.....	221
Capítulo 5: DISCUSIÓN INTEGRADORA.....	231
5.1. Viabilidad tecnológica de productos cárnicos enriquecidos con calcio.....	237
5.1.1. Elaboración de los productos cárnicos enriquecidos con calcio.....	237
5.1.2. Características físico-químicas y microbiológicas de los productos cárnicos.....	240
5.1.3. Color.....	242
5.1.4. Textura.....	247
5.1.5. Análisis sensorial.....	250
5.2. Bioaccesibilidad del calcio.....	253
5.2.1. Contenido en calcio.....	254
5.2.2. Bioaccesibilidad del calcio por el método de diálisis.....	255
5.2.3. Bioaccesibilidad del Ca utilizando la línea celular Caco-2.....	257
Capítulo 6: CONCLUSIONES.....	263
BIBLIOGRAFÍA.....	267

Listado de Abreviaturas

- AAP: Asociación Americana de Pediatría
- ACP: Análisis de Componentes Principales.
- AGNS: Food Quality and Standards Service.
- ANOVA: Análisis de varianza.
- APT: ensayo de doble compresión.
- CP: Componente Principal.
- ESPGHAN: Sociedad Europea de Gastroenterología, Hepatología y Nutrición Pediátrica (término anglosajón). Disponible en: www.espghan.med.up.pt
- FAO: Food and Agriculture Organization (organización de las Naciones Unidas para la Agricultura y Alimentación).
- FDA: Food and Drug Administration (organismo oficial, USA).
- FDAMA: Food and Drug Administration Modernization Act.
- FOHEMO: Fundación Hispana de Osteoporosis y Enfermedades Metabólicas Óseas.
- FOSHU: Food for Specidfied Health Uses.
- FUFOSSE: Functional Food Science in Europe.
- IDR: Ingesta Diaria Recomendada (RDA, término anglosajón)
- ICP-OES: técnica de acoplamiento inductivo empleada para la determinación del calcio presente en las muestras.
- ILSI: Internacional Life Sciences Institute.
- NLEA: Nutrition Labeling and Education Act.
- OMS: Organización Mundial de la Salud.
- PTH: parathormona.
- SFB: Suero Fetal Bovino.
- TEER: resistencia transmembrana.
- TIM: El modelo dinámico que consta de dos equipos, el digestor TIM-1 que simula el estómago y el intestino delgado y el TIM-2 que simula el intestino grueso.
- TNO: Toegepast Natuurwetenschappelijk Onderzoek
- ufc: unidades formadoras de colonia.

RESUMEN

Resumen

La carne y los productos cárnicos son alimentos importantes de la dieta, ya que poseen compuestos de un elevado valor biológico como los aminoácidos, vitaminas, principalmente del grupo B y minerales como el hierro, zinc y fósforo. Sin embargo, durante los últimos años, se han relacionado con algunas enfermedades como las cardiovasculares y la obesidad. Este hecho ha contribuido a un descenso de su consumo y se han convertido en objetivo de científicos e industrias cárnicas para transformarlos en nuevos productos de acuerdo con las recomendaciones nutricionales.

Por ello se han desarrollado productos cárnicos funcionales mediante el empleo de diferentes estrategias, como la incorporación de compuestos bioactivos beneficiosos para la salud. Entre ellos caben destacar diferentes tipos de fibra, polifenoles, ácidos grasos insaturados, probióticos, vitaminas o minerales.

El calcio es uno de los minerales de mayor importancia en el organismo ya que es un componente estructural esencial en huesos y dientes y forma parte de diferentes procesos fisiológicos como la contracción muscular, la coagulación sanguínea, la transmisión nerviosa y la permeabilidad celular. Su deficiencia se ha asociado con enfermedades como la osteoporosis y la hipertensión arterial. Por ello, las autoridades sanitarias recomiendan una ingesta diaria (IDR) de calcio de 1000 mg para adultos de una edad comprendida entre los 19 y 50 años (Institute of Medicine, 2010) o de 800 mg (Directiva 2008/100/CE), independientemente de la edad de los individuos.

Por lo anteriormente expuesto y por la importancia de la carne y sus derivados dentro de la dieta Mediterránea, el objetivo de esta tesis ha sido la elaboración de productos cárnicos (frescos, cocidos y madurados) enriquecidos en calcio, mediante la incorporación de diferentes sales. Se han determinado la viabilidad tecnológica y las características físico-químicas y sensoriales de los productos obtenidos. Asimismo, se ha estudiado la bioaccesibilidad del calcio a partir de aquellos con los que se obtuvieron los mejores resultados desde un punto de vista tecnológico y sensorial.

Las sales cálcicas fueron gluconato, lactato y citrato-malato cálcico y se escogieron por su alta solubilidad. Se incorporaron diferentes concentraciones, de tal forma que 100 g de producto aportasen 20%, 30% o 40% de la IDR de calcio. En los diferentes productos cárnicos se estudiaron las características físico-químicas, el color

Resumen

dentro del espacio CIE L*a*b* y la textura mediante Análisis de Perfil de Textura y Prueba de Corte. Las características sensoriales se estudiaron mediante Análisis Hedónico, Preferencial y Descriptivo Cuantitativo. Para los estudios de bioaccesibilidad se emplearon membranas de diálisis y células Caco-2, tras realizar previamente ensayos de simulación gastrointestinal, tal y como ocurre a nivel fisiológico en nuestro organismo, en los productos elaborados.

El análisis estadístico se realizó mediante un ANOVA de una y dos vías; la interacción de los distintos parámetros se estudió mediante un Análisis de Componentes Principales.

Los resultados obtenidos indican que las sales más recomendables para su utilización en productos cárnicos son lactato cálcico y citrato-malato cálcico. Su incorporación no modificó de forma significativa los parámetros tecnológicos, ni el color ni la textura. Quizás habría que resaltar que la presencia de lactato cálcico potenciaba el color en los productos frescos aumentando su luminosidad y haciéndolos más atractivos. El gluconato cálcico es la sal menos viable, siendo más evidente este comportamiento al incorporarla en productos frescos. La diferencia con las otras sales puede deberse a su mayor higroscopicidad o a que la cantidad necesaria de sal para incorporar el mismo contenido de calcio fue mayor que la de lactato o citrato-malato por lo que esta sal no resulta recomendable para el enriquecimiento de productos cárnicos.

Los resultados del análisis sensorial mostraron un comportamiento diferente en función del tipo de producto cárnico. En el caso de las hamburguesas los mejores resultados se obtuvieron con lactato cálcico, siendo incluso mejores que las puntuaciones de la hamburguesa control sin calcio. En los productos cocidos y madurados no se observaron grandes diferencias, independientemente del tipo y concentración de sal añadida. No obstante, en los tres productos cárnicos, las mayores cantidades de las sales de calcio (40% de la IDR) son las que pueden comprometer más la calidad sensorial por lo que es necesario prestar especial atención a este factor a la hora de diseñar estos productos.

La bioaccesibilidad se estudió por dos métodos *in vitro*: el método de diálisis y un ensayo con células Caco-2. Los resultados mostraron que la bioaccesibilidad del calcio a partir de lactato y citrato-malato cálcico es muy similar. Las principales

Resumen

diferencias están relacionadas con el tipo de producto cárnico y se encuentran en torno al 10% en productos frescos, 12% en cocidos y 7% en madurados. Por tanto, los productos frescos y cocidos, sobre todo los enriquecidos con citrato malato cálcico, se consideraron los más adecuados para su enriquecimiento con calcio teniendo en cuenta además, que la bioaccesibilidad fue similar a la obtenida con el calcio de la leche utilizada como control en este estudio (10%).

Se puede concluir que es posible la elaboración de productos cárnicos enriquecidos con calcio. En base a la Normativa 1924/2006 de la Unión Europea, los productos elaborados en este trabajo podrían ser considerados como *fuentes de calcio*, incrementando así la gama de alimentos enriquecidos con este mineral esencial.

SUMMARY

Summary

Meat and meat products are one of the most important foods in the diet. They contain proteins with all nine essential amino acids of high biological value, accounting for 40% of total amino acids. Moreover, they are an excellent source of bioactive compounds, including vitamins (B-complex), iron, zinc, phosphorus. However, during the last years, their connection to different diseases like cardiovascular, obesity, diabetes, even certain types of cancer has contributed to decreasing its consumption's. Therefore, scientists' and meat industries' aim is to innovate and bring new meat products, according to nutritional guides. Therefore, developing new functional meat products could be a good option. In order to achieve this greater emphasis has been placed on strategies involving the addition of bioactive compounds with recognized healthy benefits, such as proteins, fibre, polyphenols, unsaturated fatty acids, probiotics or minerals. Dietary minerals are essential for various physiological functions and they have been associated with the prevention of several diseases. Calcium (Ca) is one of the most important. It gives structural integrity to mineralized tissue; preventing osteoporosis and contributes to "bone health", although this mineral also plays other essential physiological roles as co-factor in high blood pressure, diverse cellular functions, skeletal muscle contraction and blood coagulation. As a result of these facts health authorities have recommended a Ca daily allowance (RDA) of 1000 mg for adults aged 19-50 (Institute of Medicine, IOM, 2010) or 800 mg (Directive 2008/100/EC), without concern for age.

Due to the importance of meat and meat products, the objectives of this work are the manufacturing of fresh, cooked and dry fermented sausages as examples of Mediterranean meat products enriched with different calcium salts and the evaluation of the physico-chemical and sensory properties of the final products, as well as the study of the calcium salts bioavailability from those designed meat products with excellent technological and sensory properties.

High solubility capabilities of calcium gluconate, lactate and citrate malate favoured their selection to enrich the products manufactured in order to achieve 20%, 30% and up to 40% of the RDA (Recommended Dietary Allowance). Physico-chemical characteristics were analyzed as well as colour parameters (CIEL*a*b* system) and texture using Textural Profile Analysis and Shear Analysis. Hedonic, preferential and

Summary

anchored descriptive tests were used to evaluate the sensory characteristics. Bioavailability studies were carried out with dialysis membrane and Caco-2 cells after a gastrointestinal simulation. Statistical analysis was performed using one-way and two-way ANOVA. It was also determined the Principal Components to observe the correlation between different factors.

The results demonstrated that calcium lactate and citrate malate are the most suitable salts to enrich meat products. Neither technological parameters, nor colour or texture were modified. However, calcium lactate increased the colour of fresh meat products, making them more attractive for the consumers. On the other hand, calcium gluconate favoured the higroscopicity of the product and maybe the higher amount of salt added to achieve the same percentage of enrichment makes it to be considered the less suitable option.

Sensory analysis results showed a similar behaviour when all meat products manufactured were studied. The best results were obtained in fresh meat products enriched with calcium lactate, even better than the control batch. Cooked and dry fermented sausages were similar independently of the type or amount of calcium salt. However, all the three products showed that higher calcium salts (40% of RDA) may compromise sensory characteristics of the products so it is necessary to use them carefully at the highest studied percentages.

Related to calcium's bioavailability, the results obtained with Caco-2 cells were more precise than those from dialysis membrane. Calcium lactate and citrate malate showed a similar bioaccessibility. The kind of meat products plays an important role. In this sense, the bioavailability of fresh meat products' calcium was close to 10%; 12% in cooked and 7% in dry fermented sausages. Therefore, fresh and cooked meat products enriched with calcium citrate malate were considered the most suitable products for the enrichment even due to their calcium's bioaccessibility was closest to milk (control) (10%).

Finally, our conclusions are that it is possible to manufacture meat products enriched with calcium. According to the Normative 1924/2006 of the European Union, these products could be considered like calcium's sources and they could be placed in the market as new and healthier meat products.

Capítulo 1: INTRODUCCIÓN

Capítulo 1: Introducción

El interés por la alimentación va ligado a la vida misma. En los comienzos de la Humanidad, hombres y animales emprendían cada día la búsqueda de alimentos que les permitiera subsistir en un mundo que les resultaba hostil. La especie humana ha ido descubriendo y seleccionando los alimentos hasta llegar al día de hoy en el que, tras millones de años de evolución, nos encontramos con un auténtico *arsenal* alimentario.

Es muy probable que el hombre primitivo sobreviviera con una alimentación básicamente vegetariana, pero la posición erecta y el desarrollo de la habilidad manual le convierten en un constructor de armas y en un diestro cazador (Bermúdez, 2002; Sastre, 2005).

El descubrimiento del fuego y la revolución del Neolítico junto con el desarrollo de la agricultura, centraron la vida del hombre en comunidad lo que hizo que se afincara en un terreno propio, se formaran las primeras comunidades organizadas y comenzaran a domesticar a los animales y a desarrollar la agricultura. A partir de entonces, la alimentación empezó a basarse en alimentos que el hombre producía y seleccionaba; la principal fuente de energía eran los hidratos de carbono y posteriormente las proteínas que les aportaban la caza y la pesca.

La expansión del mundo griego y romano, 500 a.C., impone la existencia de dos formas de vida y de alimentación claramente diferenciadas: el modelo costero, junto al Mediterráneo, y las regiones nórdicas, expandidas desde Centroeuropa.

En el primer escenario aparecen los cultivos de cereales, vid y olivo y la pesca y la ganadería ovina se convirtieron en un recurso permanente. Mientras tanto, en los países del norte, el hombre se mueve en búsqueda de climas más benignos en las épocas frías y así se desarrolla y potencia el nomadismo. En su alimentación predominan los alimentos fermentados, la caza y los frutos silvestres (González, 1999).

En la Antigua Grecia, en el denominado Siglo de Pericles, (460 a.C.) aparece la figura de Hipócrates, filósofo y científico al que se considera como el “padre de la Medicina”. Es quien lanza la primera idea de la relación directa entre la alimentación y los estilos de vida con la salud humana y desarrolla los fundamentos de la conocida

Introducción

como dietética hipocrática. En la época romana aparecen los grandes utensilios de cultivo, los sistemas de regadío y la cocina como arte refinado. Los romanos se alimentaban básicamente de trigo y sus derivados (panes, harinas) con los que elaboraban gachas que combinaban con todo tipo de alimentos, panes y una gran variedad de pasteles. De hecho, los artesanos del pan fueron considerados como una clase destacada. El centeno se daba solo a los animales si bien, como un castigo, se daba a los esclavos y a los gladiadores del circo romano. La fruta era también uno de los alimentos más consumidos, sobre todos la uva, los higos y las cerezas.

La Edad Media supone una mezcla de las costumbres de los pueblos del norte y del sur de Europa. Las clases sociales se diferencian no sólo por el acceso a los alimentos, sino por el refinamiento o tosquedad de los mismos. Así, el pan de trigo refinado, las carnes y pescados frescos, marcan la dieta de los poderosos mientras que el pan integral, las salazones y conservas, la de las clases sociales más humildes.

El siglo XV y los grandes viajes abren nuevas rutas al comercio. La primera globalización de la historia permite la llegada de nuevos alimentos, frutas y especias que enriquecieron de tal forma la gama de alimentos que han llegado hasta nuestros días: hablamos de la llegada del maíz, la judía, el pimiento, el tomate, cacahuete, la patata, el girasol o el cacao. Como curiosidad diremos que el gazpacho, ya citado por Cervantes en *El Quijote*, se elaboraba con aceite, ajo, agua, sal, vinagre y pan.

A finales del siglo XVIII, el gran químico francés Lavoisier se interesa por los fenómenos químicos que acaecen en el ser vivo y estableció que “la respiración es una combustión”. Posteriormente, junto con el físico Laplace fueron capaces de establecer la relación cuantitativa entre el calor emitido por un animal, el oxígeno consumido y el gas carbónico eliminado en un tiempo definido y demostrar, por primera vez, que el «calor animal» obedece a las mismas leyes que el resto de los fenómenos de la naturaleza. En 1842, Liebig publica «La química orgánica y sus aplicaciones a la fisiología y la patología» donde clasificaba los alimentos en tres tipos: combustibles, puramente energéticos, y combustibles y estructurales, siendo capaces de regenerarla arquitectura del organismo animal (Mikelsen, 1967).

La controversia sobre la importancia de las proteínas en la dieta fue dirimida por McCollum, Osborne, Mendel y Rose quienes descifraron el contenido de aminoácidos en diferentes proteínas alimentarias, afirmando que su importancia radica

Introducción

en la cualidad de sus aminoácidos: *Una proteína con aminoácidos esenciales para mantener la salud y la vida es de «alto valor biológico».* Una proteína carente de los mismos necesita complementarse para construir el mosaico de aminoácidos indispensables (Soriano del Castillo, (2006).

A principios del siglo XX, los investigadores Stepp en Alemania y Hopkins en Inglaterra demostraron que todos los animales necesitaban unos “factores alimenticios accesorios” para tener un crecimiento normal y mantener su estado de salud. Más tarde, Funk los denominó vitaminas.

A finales del siglo XIX, Liebig dará cuenta, en Alemania, de la importancia de los minerales (calcio y fósforo) en la construcción del hueso así como del hierro en la hemoglobina de la sangre. A comienzos del siglo XX se fueron anotando más de treinta elementos de esta clase, que recibieron el nombre de oligoelementos, por considerarse la oligarquía que dirige el cuerpo humano. En 1912, el biólogo inglés Hopkins publica sus experiencias con diversas dietas y sienta ya, indefectiblemente, el concepto de enfermedad carencial y la existencia de sustancias que, en representación mínima y en determinados alimentos, suponen un seguro obligatorio para la salud y la vida.

1.1. LOS MINERALES DE LOS ALIMENTOS

Los **minerales** son los componentes **inorgánicos** de la alimentación, es decir, aquellos que se encuentran en la naturaleza sin formar parte de los seres vivos. Son **necesarios** para la elaboración de tejidos, síntesis de hormonas y en la mayor parte de las reacciones químicas en las que intervienen los enzimas. Son micronutrientes inorgánicos que el organismo necesita en cantidades o dosis muy pequeñas; entre todos los minerales suman unos pocos gramos pero son tan importantes como las vitaminas, y sin ellos nuestro organismo no podría realizar muchas de las funciones metabólicas que realizamos a diario, la síntesis de hormonas o el desarrollo y crecimiento de muchos tejidos.

El término “minerales” se refiere a elementos distintos del C, H, O y N presentes en los alimentos. Estos cuatro elementos “no minerales” se encuentran formando parte principalmente de moléculas orgánicas y del agua, constituyendo un 99% del total de átomos de los sistemas vivos. Los minerales, por tanto, se encuentran en los alimentos a concentraciones mucho más bajas. Representan un 4 al 5% del peso corporal, siendo

Introducción

el calcio y el fósforo, los dos que aparecen en mayor proporción (Kathlen y col., 1998). De los 28 minerales existentes sólo una docena es considerada esencial. Sin embargo, todos ellos juegan un papel clave tanto en los sistemas vivos como en los alimentos. Todos ellos son necesarios para el ser humano al intervenir en numerosos procesos bioquímicos y fisiológicos, de tal forma que, aunque representan un 0,2-0,3% de los nutrientes ingeridos en la dieta, la importancia de los mismos es tal que sin ellos se desaprovecharía hasta un 99,7% de los nutrientes aportados por un alimento (Nabrzyski, 2002).

Históricamente, los minerales se han clasificado como mayoritarios o elementos trazas, dependiendo de la concentración en la que se encuentran en los sistemas biológicos. Esta clasificación surgió en un momento en el que los métodos analíticos no permitían determinar concentraciones bajas de estos elementos; por ello, el término *traza* se utilizaba para indicar la presencia de un elemento que no podía medirse con mucha precisión. A pesar de que hoy en día existen métodos analíticos muy precisos, estos términos se siguen empleando (Miller, 2010).

Es importante tener en cuenta que esta primera clasificación está hecha en función de la cantidad en la que se encuentran, pero no refleja la importancia de los minerales, ya que la deficiencia de un determinado mineral en unos pocos miligramos puede ser igual o más perjudicial que la deficiencia de una mineral que se requiere en grandes cantidades (Nabrzyski, 2002).

Actualmente, según la dosis necesaria se dividen en dos grupos:

➤ macroelementos: sus necesidades superan los 100 mg diarios: calcio, magnesio, potasio, sodio, cloro, azufre y fósforo. Las funciones de estos minerales están ligadas entre otras al desarrollo del hueso, regulación de los líquidos del cuerpo y secreciones digestivas (Nabrzyski, 2002; Vasudevan y col., 2011).

➤ microelementos (oligoelementos) o elementos traza: sus necesidades son menores a los 100 mg diarios. Dentro de este grupo de minerales, los más destacados son el hierro, zinc, cobre, manganeso, yodo, cobalto, níquel, molibdeno, cromo, flúor, selenio y vanadio. Sus funciones están relacionadas con numerosas reacciones bioquímicas, ayudan a reducir la fatiga y lograr un mejor estado físico y mental (Nabrzyski, 2002).

Introducción

En España, el Real Decreto 1487/2009 de 26 de septiembre, relativo a los complementos alimenticios, los considera como nutrientes de los alimentos, junto con las vitaminas, aminoácidos, ácidos grasos esenciales, fibras, diversas plantas y elementos vegetales.

La importancia de estos oligoelementos quedó reconocida desde 1993 cuando diferentes organismos internacionales establecieron recomendaciones adecuadas de ingesta en la dieta diaria (SCF, 1993).

En nuestra dieta, es importante respetar la proporción de cada uno de los minerales puesto que en el organismo funcionan de manera interdependiente, esto quiere decir que elevadas dosis o concentraciones de algunos pueden inhibir la absorción de otros porque compiten entre sí. Así la ingesta de potasio debe ser de cuatro a siete veces superior a la de sodio para que el transporte hasta las células sea el óptimo.

Centrándonos en el calcio, uno de los macroelementos anteriormente citados, mencionar que desde el comienzo de la agricultura, la principal fuente de alimentación fueron las semillas y frutas (Eaton y Konner, 1985), pero la cantidad de ese mineral en dichos productos es bastante reducida o, aunque presente una elevada concentración del mismo como en el caso de las espinacas y diferentes especies de coles (Charonenkiatkul y col., 2008) su absorción a nivel intestinal es bastante deficitaria debido a las interacciones producidas por la presencia de fibra vegetal (Heany y col., 1988; Weaver y Heany, 1991). Sin embargo, es un hecho reconocido que la principal fuente de este mineral es la leche y los productos lácteos, aunque también se podría destacar la presencia de este mineral a parte de los vegetales, en algunos pescados y mariscos (McCance y Widdowson's, 2015).

1.1.1. Los minerales como elementos esenciales

Se han propuesto varias definiciones de lo que es un elemento esencial, pero la más ampliamente aceptada es la de Underwood (1981): *un elemento es esencial para la vida si su eliminación de la dieta u otra ruta de exposición del organismo conduce a un deterioro constante y reproducible de una función fisiológica determinada.*

Según Tolonen (1990), un mineral es considerado un elemento esencial cuando su aporte en la dieta es importante para el desarrollo del individuo y su déficit causa un

Introducción

desorden funcional o alguna forma de reducción funcional.

Los minerales son esenciales para cientos de reacciones enzimáticas en el organismo y son la clave principal de la regulación del metabolismo. Los minerales mantienen el equilibrio ácido-básico (es el caso del sodio, potasio y el cloro) y la presión osmótica (sodio y potasio), facilitan el transporte, a través de la membrana, de compuestos esenciales y mantienen la actividad nerviosa y muscular.

Su importancia radica también en que son constituyentes estructurales de los tejidos; así, calcio, fósforo, zinc, magnesio o flúor forman parte de la composición de huesos y dientes. Son esenciales para combatir el raquitismo o controlar la osteoporosis al conferir fuerza y rigidez en los huesos y dientes (calcio, magnesio), facilitan el transporte del oxígeno y del dióxido de carbono en la sangre (hierro y cobre), son necesarios para la división celular y en el proceso de crecimiento. También participan (azufre y selenio) en la producción de ciertos aminoácidos (cisteína y metionina) que son los pilares del pelo, uñas y piel. La molécula de vitamina B₁₂ contiene un átomo de cobalto y yodo que es vital para el funcionamiento de la glándula tiroidea. También la falta de zinc se ha asociado con problemas en el sistema inmunitario y la falta de magnesio y selenio a enfermedades cardíacas y ciertas formas de cáncer (Nabrzyski, 2002). Incluso, algunos minerales están asociados con enfermedades genéticas y se conoce la interacción de los mismos con el ADN (Stathopoulou y col., 2012).

Las deficiencias de algunos minerales son frecuentes mientras que para otros son raras o inexistentes (Mataix, 2009). Existen evidencias científicas sobre las deficiencias dietéticas de minerales como calcio, cromo, cobalto, yodo, selenio, hierro y zinc. Las deficiencias varían ampliamente en función de la zona geográfica y de la situación socioeconómica. Actualmente, los estados de deficiencia de minerales ocurren con mayor frecuencia que los de vitaminas, siendo las personas que consumen dietas bajas en calorías o vegetarianas, las que se encuentran en la tercera edad, las mujeres embarazadas y las personas medicadas con diuréticos, los grupos de población con mayor riesgo de padecer dichas deficiencias.

1.1.2. Determinación del contenido de minerales

La determinación del contenido mineral total de un alimento es necesaria para calcular los carbohidratos totales en un esquema analítico general. Su análisis supone la incineración total de un alimento (normalmente en medio ácido) con el resultado de

Introducción

la obtención de unas cenizas en las que se encuentran los minerales. Sin embargo, esta técnica sobreestima el contenido en minerales ya que éstos se encuentran en forma de óxidos, sulfatos, fosfatos, nitratos, cloruros y otros haluros. Para la estimación de los minerales individuales se utilizan métodos instrumentales específicos que son rápidos y precisos.

Uno de los primeros artículos que describe el empleo de la espectrometría es el realizado por Kessler y Wolfman (1964) que emplearon dicha técnica para analizar el calcio presente en muestras orgánicas. No obstante, el empleo de esta técnica se ha ido perfeccionando a lo largo de los años. La espectroscopía de absorción atómica se utilizó en la década de 1990 y aún hoy es considerada como uno de los métodos más efectivos; es una técnica fiable pero solo mide un mineral cada vez, aún queriendo optimizar el sistema mediante inyección secuencial de las muestras (Oliveria y col., 2000). Los espectrómetros de plasma acoplado inductivamente han ganado terreno en los últimos años, sobre todo porque permiten cuantificar varios minerales a la vez a partir de una muestra única (ver capítulo 3: Material y Métodos).

1.1.3. Absorción y transporte de minerales

Los minerales se encuentran en los alimentos de diferentes formas químicas y su absorción a nivel intestinal se realiza como cationes, como partes de grupos aniónicos o en asociaciones covalentes con otras moléculas orgánicas. Esta absorción depende entre otros muchos factores de las necesidades del organismo, p.e. si se está en período de crecimiento o de lactancia, etc. así como de la forma química en la que se encuentran.

En términos generales, la ingesta excesiva de minerales reduce su absorción; este es el caso del calcio, en el que su absorción es más eficiente cuando se ingiere poca cantidad y disminuye cuando se ingiere a altas dosis (Cummings y col., 1993). La absorción de otros minerales como el magnesio, zinc, hierro y cobre están sujetos a una fuerte regulación homeostática. Otros factores que pueden afectar negativamente a la absorción de dichos compuestos son el tiempo de tránsito de los alimentos en el aparato digestivo, el pH del estómago e intestino, la formación de sales insolubles, las interacciones con otros minerales como por ejemplo el hierro y el zinc que compiten por el mismo transportador y los diferentes estados del consumidor (edad, situación fisiológica, etc.) (Latham, 2002; Bouillon y col., 2003; Feldman y col., 2011).

Introducción

Una vez absorbidos, son transportados para llegar a los órganos diana donde realizarán la función correspondiente. Generalmente, los minerales se encuentran en el organismo en las células y en el plasma, unidos a proteínas y otras moléculas y en una pequeña proporción, en forma iónica libre. El transporte se lleva a cabo por proteínas séricas, que han sido identificadas como imprescindibles para el calcio, zinc, hierro y cromo (Latham, 2002).

El transporte es diferente de unos minerales a otros. Por ejemplo, el yodo de la dieta (I_2) se oxida en el tracto gastrointestinal a yoduro (I^-) que se absorbe prácticamente en su totalidad, almacenándose la mayor parte en la glándula tiroidea (Vasudevan y col., 2011). El hierro absorbido puede ser transferido a la sangre asociado a la transferrina o almacenarse en la misma mucosa digestiva como ferritina (Moreno, 2000). El selenio se une a la albúmina, VLDL y LDL, y se dirige a los tejidos donde ejerce su acción concentrándose especialmente en eritrocitos, hígado, bazo, corazón y uñas (Vasudevan y col., 2011).

Dentro del organismo, calcio, fósforo, magnesio, zinc y flúor se almacenan fundamentalmente en el esqueleto. Otros minerales como el zinc, hierro, cobre y selenio se almacenan en el hígado. Esto es importante ya que estos reservorios tanto hepáticos como óseos, pueden movilizarse para distribuir los minerales por otros tejidos en estados de necesidad (Schaafsma y col., 2001).

Los minerales que son absorbidos en un porcentaje superior a sus requerimientos, se eliminan por diferentes rutas de excreción como la vía renal o a través del fluido pancreático o la bilis en el intestino. El sodio y el potasio, por ejemplo, son absorbidos en su totalidad por el intestino delgado y su excreción es regulada por el riñón para mantener constante su concentración plasmática (Tolonen, 1990). La excreción del calcio se realiza por las heces y orina en un 50% aunque este porcentaje varía a lo largo de la vida, de tal forma, que a medida que aumenta la edad, la excreción es mayor, si bien a partir de los 60-65 años, disminuye.

La piel es otro de los órganos encargados de la pérdida de minerales a través del sudor o la exfoliación, como es el caso del selenio.

1.1.4. Minerales y salud

Los minerales juegan un papel fundamental en la regulación metabólica y fisiológica. Como se ha mencionado anteriormente, se necesita una ingesta adecuada para mantener la homeostasis, su funcionalidad y salud. Hoy en día, las deficiencias en los niveles requeridos para ciertos minerales son más frecuentes que las debidas a déficits de vitaminas.

Magnesio

El magnesio es un mineral esencial para las funciones celulares y constituye una pieza clave en todas las reacciones con fosfatos. Las células requieren magnesio para la división celular y la producción de enzimas que regulan el metabolismo de proteínas, carbohidratos, lípidos y ácidos nucleicos (Lukaski, 2004). Los niveles bajos de magnesio están relacionados con numerosas enfermedades gastrointestinales, disfunciones renales, defectos en la reabsorción de cationes, causas iatrogénicas como alimentación enteral o parenteral deficitaria en magnesio, el uso de medicamentos que interfieren en su absorción, malnutrición general y alcoholismo (Moreno, 2000; Vasudevan y col., 2011). Su deficiencia también afecta a la función cerebral y se manifiesta, entre otros, en anorexia y cambios de personalidad (Anderson y Allen, 1994).

Cuando se produce una deficiencia de magnesio, se produce la salida de este mineral y de potasio de las células y la entrada de calcio y sodio. El sodio favorece la liberación de calcio de la mitocondria y la formación de AMP, aumentando así la permeabilidad de las membranas lo que ocasiona con frecuencia la muerte celular (Tolonen, 1990).

Se han observado bajos niveles séricos de magnesio en atletas inmediatamente después de realizar actividad física como consecuencia de la sudoración y la respiración extrema. Esta pérdida produce calambres musculares, descenso del metabolismo aeróbico y reducción del rendimiento (Rayssiguier y col., 1990; Korstanje y Hoek, 2001).

En general, el magnesio es de gran importancia para el conjunto del sistema circulatorio ya que previene el aumento de la presión sanguínea y reduce así el riesgo de enfermedades cardiovasculares como el infarto de miocardio. Así mismo se ha

Introducción

descrito que la deficiencia de magnesio puede ocasionar arritmia cardiaca y un aumento de la sensibilidad del músculo cardiaco a la digoxina (Tolonen, 1990; Vasudevan y col., 2011). El magnesio es especialmente importante en el músculo cardiaco ya que su presencia es crítica para la síntesis de ATP (Dyckner, 1980; Seeling, 1980; Vasudevan y col., 2011). Las ATPasas en el músculo cardiaco requieren gran cantidad de este mineral y por ello su deficiencia puede comprometer su óptimo funcionamiento, especialmente en personas de edad avanzada.

Debido a que este mineral es también un importante constituyente del esqueleto, juega un papel relevante en la osteoporosis. Se ha observado que el contenido de magnesio en la dieta de personas con osteoporosis es menor que en las personas que no sufren esta enfermedad. Aunque la importancia de la relación calcio/magnesio como factor de la osteoporosis no está totalmente esclarecida, existen estudios que avalan la hipótesis de que una relación de estos minerales de 4:1 en mujeres menopáusicas reduce la absorción de magnesio y este hecho junto con la disminución de estrógenos, resulta en un menor movimiento de magnesio al hueso y una mayor actividad desmineralizante de la hormona paratiroidea (Korstanje y Hoek, 2001).

Hierro

El hierro es el cuarto elemento en abundancia en la corteza terrestre y un mineral esencial para casi todos los seres vivos. Juega un papel fundamental en los sistemas biológicos ya que participa en el transporte y almacenamiento de oxígeno en los organismos superiores (hemoglobina y mioglobina), generación de ATP (proteínas ferrosulfuradas y citocromos), síntesis de ADN (ribonucleótido reductasa) y de clorofila, síntesis de neurotransmisores, el funcionamiento de numerosas enzimas y del sistema inmune. Además, el metabolismo de las vitaminas que forman el complejo B es hierro-dependiente (Lukaski, 2004; Hänsch y Mendel, 2009).

Sin embargo, el hierro puede llegar a ser tóxico ya que es un agente pro-oxidante que favorece la formación de especies reactivas al oxígeno en los tejidos del organismo humano y en consecuencia, el enranciamiento de la grasa y la oxidación de vitaminas A, C y E y proteínas (Tolonen, 1990).

Con el fin de evitar esta toxicidad, las células poseen un mecanismo de almacenamiento del hierro excedente mediante su inclusión en una estructura proteica esférica y hueca denominada ferritina; el hierro almacenado representa

Introducción

aproximadamente el 25% del total presente en el organismo. La ferritina se encuentra principalmente en el hígado, el bazo, la médula ósea y en las células del sistema reticuloendotelial (Schreiber, 1999). El hierro permanece almacenado hasta que el organismo lo necesita; en ese momento, se libera y se une a la transferrina, la proteína plasmática circulante que lo transporta hasta las células eritropoyéticas (Sherwood, 2010). Esta proteína se encuentra en el suero en bajas concentraciones, y su cantidad es directamente proporcional a las reservas de hierro del organismo (Miale, 1992). Por ello, la concentración de ferritina, es un elemento valioso en el diagnóstico de las anemias ferropénicas y trastornos tales como la talasemia y la hemocromatosis que se asocian a un exceso de hierro (Sherwood, 2010).

El hierro que se encuentra libre en sangre, será almacenado en órganos como la médula ósea donde será empleado para producir hemoglobina, la cual será liberada al torrente sanguíneo. Tras un período de recirculación en el mismo, pasará al bazo para ser degradada a hemosiderina y posteriormente ser transformada, en el hígado, en pigmentos biliares.

El déficit de este mineral repercute negativamente en la producción de hemoglobina, con la consecuente aparición de anemia ferropénica, una de las patologías más frecuentes a nivel mundial (Eichner, 1992). Por otra parte, la deficiencia de hierro puede aumentar el riesgo de contraer enfermedades infecciosas debido al deterioro de los mecanismos de defensa de los glóbulos blancos. Así, la capacidad de los linfocitos T de identificar virus, bacterias y células cancerígenas es dependiente del hierro. (Cherayil, 2011).

Pese a que la absorción del hierro procedente de la alimentación es escasa, el organismo mantiene cuidadosamente sus reservas al reabsorber la mayor parte del hierro liberado de la degradación de los hematíes.

Su absorción es muy variable y depende fundamentalmente de la forma en que se encuentra. En alimentos de origen animal hay una parte en forma hemo, siendo éste el más absorbible y otra en forma inorgánica. Sin embargo, en los alimentos de origen vegetal se encuentra prácticamente en su totalidad en forma inorgánica. Por ello, el hierro absorbido en alimentos de origen animal es muy superior (14-18%) al absorbido a partir de alimentos vegetales (5-12%) (Hurrell y Egli, 2010).

Introducción

Zinc

El zinc es un mineral esencial que se concentra mayoritariamente en la piel, y su déficit conlleva la aparición de lesiones cutáneas o el retraso en la curación de heridas o quemaduras. Además de los problemas dermatológicos, también produce otros síntomas como pérdida de apetito, alteraciones inmunológicas, hiposmia e hipogeusia. Deficiencias prolongadas de zinc ocasionan retrasos en el crecimiento, hipogonadismo y enanismo e incluso disfunciones cerebrales, como la dislexia (Prasad, 1985; Latham, 2002).

El zinc es también esencial para la actividad de muchas enzimas (aprox. 200 enzimas) ya que su afinidad por el nitrógeno, oxígeno y azufre, es tal, que interviene coordinando a nivel químico la modulación biológica del organismo en la formación de tejido óseo, en la síntesis de proteínas, de ARN, de insulina y en el metabolismo de carbohidratos. Participa en la reparación del ADN, en la proliferación celular, en la diferenciación y apoptosis que envuelve varios factores transcriptómicos (Hänsch y Mendel, 2009; Shariff y col., 2012). Además, forma parte de la enzima superóxidodismutasa que posee actividad antioxidante (Moreno, 2000).

La deficiencia de zinc está asociada no solo a dietas pobres en este mineral sino a su baja biodisponibilidad así como a las pérdidas por sudoración profusa. Además, puede provocar situaciones de estrés por intervenciones quirúrgicas o quemaduras, cirrosis hepática y alcoholismo (Moreno, 2000).

El zinc es, además, requerido para el metabolismo de la vitamina A y para la transformación de ácido linoleico a ácido γ -linoleico que es a su vez requerido para la producción de prostaglandinas (Tolonen, 1990).

Fósforo

El fósforo se encuentra en la naturaleza combinado en forma de fosfatos inorgánicos. La mayor parte se localiza en los dientes y en los huesos, de hecho, es componente esencial, junto con el calcio, del sistema esquelético (Greenwood y Earnshaw, 1997).

El fósforo contribuye a la producción de ATP. Las células lo emplean para almacenar y transportar energía y además, la adición y eliminación de grupos fosfato a las proteínas (fosforilación y desfosforilación), es el mecanismo principal que regula la

Introducción

actividad de las proteínas intracelulares y de ese modo el metabolismo de células eucariotas.

El fósforo, junto con las vitaminas del complejo B, contribuye al correcto funcionamiento de los riñones, la contracción muscular, del músculo cardíaco y la transmisión nerviosa (Suttle, 2010).

Selenio

El selenio forma parte de las denominadas selenioproteínas, proteínas esenciales para nuestro organismo, de las cuales caben destacar: i) las peroxidasas, que tienen importantes propiedades antiinflamatorias y protegen las membranas de las células del daño producido por los radicales libres; ii) las deiodinasas, que participan en la producción de hormonas tiroideas activas y iii) las enzimas implicadas en la síntesis y la reparación del ADN (Suttle, 2010). La glutatión peroxidasa en mamíferos, es la enzima que contiene en mayor proporción este mineral.

El selenio se encuentra en elevadas concentraciones en los testículos, siendo necesario para la formación de espermatozoides. También actúa como un antioxidante intracelular no-específico por lo que su presencia disminuye los requerimientos de vitamina E y viceversa (Bañuelos y col., 2012).

Los niveles de selenioproteínas se alcanzan siguiendo una alimentación normal y no aumentan al ingerir suplementos (Marmot y col., 2007; Bjelakovic y col., 2008). No obstante, el consumo subóptimo de este elemento puede reducir la producción de selenioproteínas, lo que a su vez afectaría a la reparación del ADN, reduciría las respuestas inmunes y antiinflamatorias y su déficit está relacionado también con la aparición del hipotiroidismo (Bañuelos y col., 2012).

Aunque hay mecanismos plausibles por los cuales las selenioproteínas podrían reducir el riesgo de cáncer (por ejemplo, por la eliminación de los radicales libres que dañan el ADN), existen pocas pruebas que lo demuestren excepto en el caso del cáncer de próstata, puesto que las selenioproteínas participan en la producción de testosterona, que es un importante regulador del crecimiento normal y anormal de la próstata (Marmot y col., 2007).

Introducción

A pesar de que se ha estudiado su relación con enfermedades cardiovasculares, Navas-Acien y col., (2008) no han encontrado evidencias de protección cardiovascular y los estudios con suplementos no son concluyentes.

Cromo

El cromo está implicado en la regulación de la glucosa, lípidos y del metabolismo de las proteínas, potenciando la acción de la insulina a nivel celular y reduciendo sus necesidades fisiológicas (Lukaski, 1999; Vincent, 2000)

No se ha estipulado una ingesta diaria recomendada para este mineral, pero se considera que es en torno a 25-35 µg/d para mujeres y hombres respectivamente (Parlamento Europeo, Directiva 2008/100/CE), siendo las frutas, hortalizas y semillas las principales fuentes de aporte de este mineral. El cromo se excreta a nivel renal y aumenta en aquellos individuos que realizan un ejercicio físico (Lukaski, 2004).

Cobre

El cobre interviene en varios procesos del organismo, al encontrarse como cofactor en numerosas metaloproteínas. Interviene en la coagulación sanguínea, en la síntesis de adenosina y en la actividad ferroxidasa, entre otras (Turlund, 1998).

Los niveles sanguíneos de cobre son regulados por la actividad homeostática del hígado (Harris, 2000), el cobre que es liberado del hígado (70-95%) a sangre, es transportado por la ceruloplasmina, o si no, es excretado a la bilis (Ralph y McArdle, 2001).

Las deficiencias de este mineral se manifiestan con anemia, neutropenia y problemas a nivel óseo, entre otras (Turlund, 1998).

1.2. CALCIO: fisiología e importancia

De los 83 elementos presentes en la naturaleza, el calcio es el quinto más abundante y el cuarto en el organismo humano. Pertenecen al grupo de los alcalinotérreos y sus derivados constituyen el 3,64% del presente en la corteza terrestre. Es esencial en los seres vivos por intervenir en numerosas funciones como se verá a continuación (Gadomska-Nowak y col., 2008).

1.2.1. METABOLISMO Y FUNCIONES DEL CALCIO

En un adulto el calcio representa el 2% del peso corporal, se corresponde con una cantidad aproximada de 1200 g y se encuentra principalmente (99%) en el esqueleto y en los dientes. El 50% de los huesos está formado por calcio y fósforo en una relación 2:1. Estos dos minerales forman fosfato cálcico que aparece en dos diferentes estados: fase amorfa y fase cristalina. Esta última es la hidroxiapatita $[\text{Ca}_{10}(\text{PO}_4)_6(\text{OH})_2]$ y se dispone alrededor de una matriz orgánica de colágeno que constituyen el 85-90% de las proteínas del sistema óseo (Currey, 2000) siendo las encargadas de proporcionar fuerza y rigidez a los huesos (Doblaré y col, 2004; González y col., 2008). El resto de proteínas (p.e. osteocalcina) participan del proceso de mineralización de los huesos, ligando no solo calcio y fósforo sino otros elementos como flúor, magnesio, zinc y sodio que forman parte del sistema óseo, cubriendo los cristales de hidroxiapatita. Esto mismo ocurre en el esmalte y la dentina de los dientes (Currey, 2000).

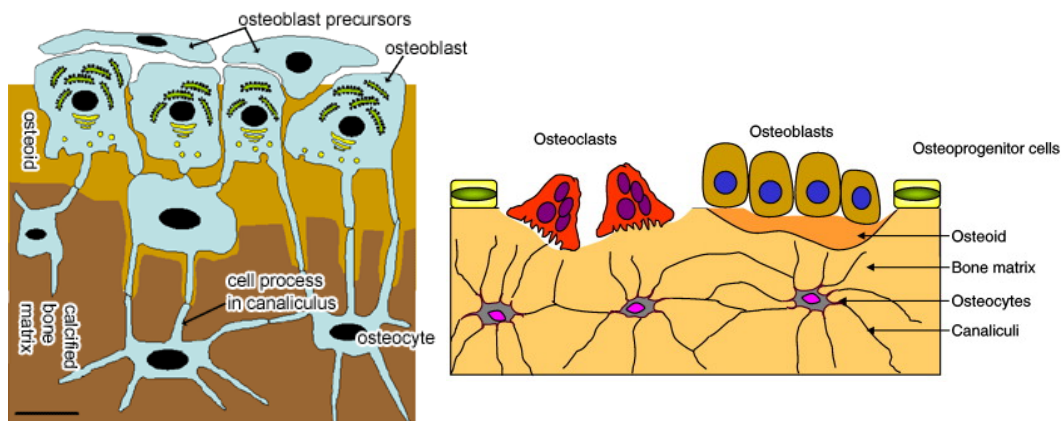
El 50% restante del hueso son células. Inicialmente se encuentran las células madre óseas (osteoprogenitoras) situadas en la superficie interna y externa de los huesos; son células indiferenciadas que durante la osificación se diferencian en células formadoras de hueso (osteoblastos) o por el contrario, se diferencian a células desmineralizantes (osteoclastos) (Peacock, 2010). La capacidad divisoria de los osteoblastos es alta, y de su diferenciación se forman los osteocitos que son las células responsables del mantenimiento de la matriz ósea, por su capacidad de sintetizar y reabsorber la matriz. Así se forma el hueso inicial no mineralizado u osteoide (Figura 1).

Finalmente, en el tejido óseo se encuentran también, los osteoclastos, células multinucleadas situadas sobre la superficie del hueso, cuya función es la resorción

Introducción

ósea. Como resultados de su actividad, se forman las denominadas lagunas de resorción (Currey, 2000) (Figura 1).

Figura 1: Tipos de células implicadas en el crecimiento del hueso
http://www.histology.leeds.ac.uk/bone/bone_cell_types.php
<http://ars.els-cdn.com/content/image/1-s2.0-S0169409X09002336-gr1.jpg>



El hueso actúa como reserva de calcio en el organismo, de tal forma, que según el estado fisiológico en el que se encuentre, se producirá una resorción por parte de los osteoclastos para liberar dicho mineral al torrente sanguíneo o una mineralización, llevada a cabo por los osteoblastos. La actividad de estas células estará controlada a nivel hormonal y por los niveles de calcio en sangre. Así, en estados fisiológicos en los que se requiera un aporte elevado, como durante el embarazo o la lactancia, los osteoclastos favorecerán la liberación del calcio de la matriz ósea. Si la ingesta de calcio es baja, se reducen las reservas de dicho mineral en la matriz ósea, por lo que su resorción puede favorecer el desarrollo de enfermedades óseas.

El calcio no esquelético constituye aproximadamente un 1% del calcio total en el organismo y aproximadamente, el 0,9% se encuentra en los tejidos blandos, en estructuras y membranas celulares, influyendo en su permeabilidad y en la activación de sistemas enzimáticos intra y extracelulares (Berridge, 1998). El 0,1% restante está presente en el torrente sanguíneo y en fluidos extracelulares (Straub, 2007). Este calcio está presente en forma iónica y ejerce un papel crítico en la actividad neuromuscular y la transmisión nerviosa al liberar los neurotransmisores en las uniones sinápticas (Berridge, 1998). Así mismo, participa en la coagulación sanguínea al estimular la liberación de tromboplastina plaquetaria; actúa como cofactor en la transformación de

Introducción

protrombina a trombina y en la polimerización del fibrinógeno a fibrina (Berridge, 1998).

Para que todas estas funciones se desarrollen de forma adecuada es importante que su concentración se mantenga constante en un determinado intervalo de valores, lo que se consigue gracias a su complejo sistema homeostático de control (Rovira y Pons, 1999; Maïmoun y Sultan 2009), llevado a cabo por las hormonas calciotrópicas (la hormona paratiroidea (PTH), la calcitonina, la 1,25-dihidroxivitamina D₃ [1,25(OH)₂D₃]) (Peacock, 2010), el calcio ionizado presente en el torrente sanguíneo (niveles séricos habituales de calcio: 8,8-10,8 mg/dl) (Devlin, 2004) y los receptores de este mineral en el tracto gastrointestinal, riñón y huesos (Peacock, 2010).

La PTH se secreta por las glándulas paratiroides; estructuralmente es un polipéptido constituido por 84 aminoácidos (PTH-1-84). En la circulación hepática y renal, la PTH sufre una hidrólisis y da lugar a fragmentos que contienen la región aminoterminal (PTH 1-34), la región media (PTH 44-48) o la región carboxilo terminal (PTH 53-84); las tres coexisten en la circulación sistémica pero solo la PTH 1-34 es la que influye en la homeostasis del calcio.

La calcitonina (CT) es un polipéptido de cadena única de 32 aminoácidos y es el principal compuesto secretado por las células C o parafoliculares de la glándula tiroides. Se secreta en forma de dímero sin actividad biológica y en la sangre se transforma en monómeros biológicamente activos. Su acción biológica es la regulación de la calcemia; así, la CT se secreta en cantidades grandes cuando la calcemia aumenta y vuelve a niveles normales cuando se normaliza. La principal actividad de la CT es frenar la actividad y disminuir el número de osteoclastos, así como inhibir la reabsorción osteocítica. Además de su función esquelética, la CT es un regulador de la excreción urinaria de calcio.

La vitamina D₃ o calcitriol es una hormona esteroidea derivada de la vitamina D₃. Se sintetiza en la piel o se adquiere con la dieta. El calcitriol es el más potente de los estímulos fisiológicos para la absorción de calcio; a dosis fisiológicas, es clave en la mineralización del hueso y es un potente estimulador de la actividad osteocítica. Sus niveles en sangre determinan el ritmo de biosíntesis de la hormona paratiroidea.

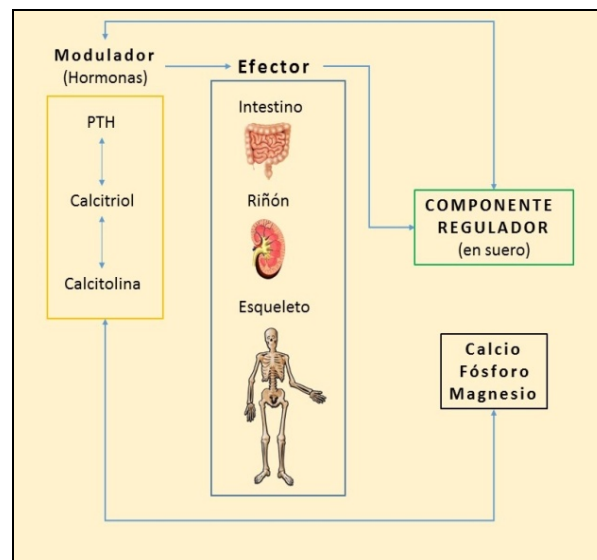
El intestino es el encargado de absorber calcio, bien el que está presente en el bolo alimentario o bien en las secreciones entéricas. El riñón es el órgano que controla

Introducción

la excreción de minerales (Ca, P y Mg) por la orina y define su balance corporal. El riñón es el principal productor de la 1-hidroxilasa y por lo tanto responsable de la síntesis de la vitamina D₃, el más potente promotor de la absorción intestinal de calcio (Ávila y col., 2007).

La homeostasis mineral se mantiene por la interacción de tres sistemas: a) componente modulador que es el sistema hormonal PTH, vitamina D₃ y calcitonina; b) componente efector que son los órganos diana y c) regulador, representado por la concentración de minerales en los fluidos corporales intra- y extracelulares (Figura 2).

Figura 2: Interacción de los tres sistemas implicados en la homeostasis del calcio



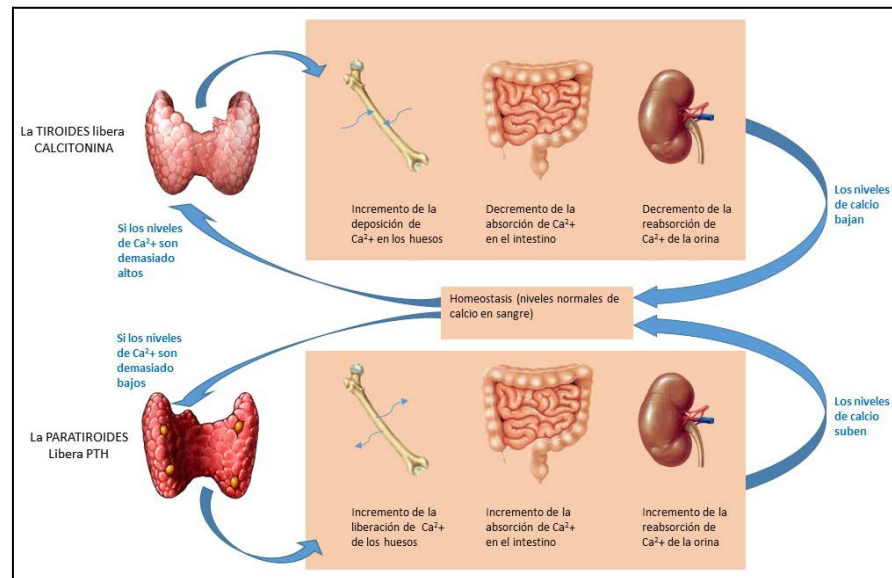
Estos tres sistemas actúan de forma conjunta de tal forma que el componente modulador estimula o inhibe la actividad del componente efector, mediante la secreción o no de sus hormonas y la secreción hormonal determina la concentración intra y extracelular de minerales así como por la concentración de las mismas hormonas (Vidal, 2006).

Cuando disminuye la concentración sérica de calcio, se produce una respuesta instantánea a nivel de las paratiroides que secretan PTH, que provocará una osteolisis y compensará el déficit, elevando la calcemia. Si la situación persiste o su corrección es incompleta, se secretará más PTH, lo que aumentará la producción de vitamina D₃ e incrementará a su vez la reabsorción intestinal y renal de calcio. Si persiste la hipocalcemia, se estimulará aún más la reabsorción de calcio a partir de la matriz mineral del esqueleto, al activarse los osteoclastos (Barret y col., 2010) (Figura 3).

Introducción

Una vez que la concentración de calcio en suero alcanza los niveles normales, el “sensor” de calcio en las glándulas paratiroides inactiva la secreción hormonal y se mantiene así su nivel basal (Maïmoun y Sultan, 2009).

Figura 3: Regulación hormonal del calcio



Por el contrario, si el calcio sérico aumenta, se secreta calcitonina en cantidad suficiente para inhibir la osteolisis y favorecer la excreción urinaria de calcio; de este modo, la calcemia retorna a su valor normal. Si persiste elevada, la calcitonina inhibe la resorción osteoclástica y simultáneamente se inhibe la secreción de PTH y la síntesis de vitamina D₃. Estos mecanismos, conllevan una mayor eliminación de calcio por el riñón, una disminución del recambio esquelético y a una pobre absorción intestinal del calcio; de esta manera la calcemia regresa a los valores normales (Maïmoun y Sultan, 2009).

Las concentraciones séricas de este mineral varían según el sexo y así, en varones, las concentraciones se sitúan en torno a 2,5 nmol/l, mientras que en mujeres, son ligeramente inferiores, 2,35-2,39 nmol/l (Jorde y col., 2001; Domke y col., 2006).

La ingesta máxima de calcio en el organismo es de 2500 mg/día. Cantidades superiores provocan la saturación de la membrana de las células del epitelio intestinal, lo que reduciría su absorción (Mensink y col., 2002; Maïmoun y Sultan, 2009).

La principal vía de eliminación de calcio es la renal, siendo secundarias la fecal y el sudor. El riñón regula la excreción de calcio del organismo por dos mecanismos:

Introducción

filtración glomerular y reabsorción en los túbulos proximal y distal. El glomérulo filtra alrededor del 50% del calcio sérico y se estima entre 7-10 g calcio/día. El resto de calcio está unido a proteínas. La mayor parte de la reabsorción de calcio ocurre en el túbulo proximal, depende de la concentración intraluminal de calcio y no está regulada hormonalmente. Al túbulo distal sólo llega alrededor del 10% de calcio filtrado y es el que puede reabsorberse con distinta intensidad en función de las tasas circulantes de PTH (Rovira y Pons, 1999).

En el torrente sanguíneo, el calcio puede estar en tres estados diferentes: como ión libre (45%); ligado a proteínas, principalmente a la albúmina (40%) o formando complejos con ácidos orgánicos como el citrato o inorgánicos como el fosfato (15%). El calcio iónico es la única forma ultrafiltrable, la que ejerce una acción biológica y se encuentra, por tanto, sujeta a control hormonal (Rovira y Pons, 1999).

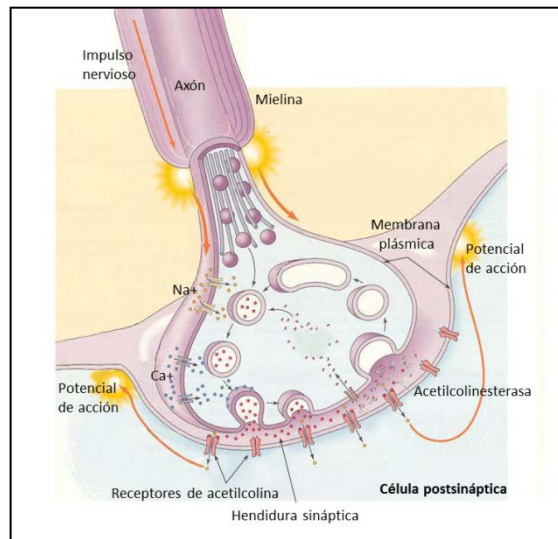
1.2.2. EL CALCIO Y SU ACTIVIDAD A NIVEL CELULAR

Además de su función ósea, el calcio desempeña también importantes funciones tanto a nivel celular como extracelular:

➤ **Mantenimiento de la funcionalidad de la membrana celular:** La concentración de calcio dentro y fuera de la célula se mantiene siempre en equilibrio: los niveles intracelulares oscilan entre 100-200 nmol y los extracelulares, en torno a 10^6 nmol. La salida al medio exterior se realiza por un mecanismo de transporte activo que se lleva a cabo gracias a una bomba de calcio existente en la membrana plasmática (canales de calcio) y que utiliza la energía proporcionada por la hidrólisis de ATP (Guéguen y Pointillar, 2000). Los niveles de calcio citoplasmático actúan como señal moduladora favoreciendo la activación de los canales de membrana y de segundos mensajeros que permiten el intercambio iónico entre ambos medios (Kelly, 1995).

➤ **Transmisión del impulso nervioso:** En el sistema nervioso, los impulsos se transmiten a través de la membrana sináptica (Figura 4). El impulso nervioso provoca un cambio de voltaje en la membrana y la liberación de neurotransmisores los cuales atraviesan la hendidura sináptica y se unen a los receptores de otra célula.

Figura 4: Esquema de los canales de calcio presentes en la membrana sináptica.
(<http://scykness.files.wordpress.com/2013/04/52.jpg>).



La liberación del neurotransmisor es por exocitosis y es calcio dependiente. Cuando una neurona presináptica recibe un impulso nervioso, abre los canales de calcio, entrando el neurotransmisor en la neurona y liberándose en el espacio sináptico. El calcio además de iniciar la exocitosis, activa el traslado de las vesículas que contienen el neurotransmisor a los lugares de su liberación con la ayuda de proteínas de membrana plasmática y de la membrana vesicular (Takei y col., 1992; Martone y col., 1997; Berridge, 1998).

También es importante destacar que el retículo endoplásmico (RE) juega un papel importante al intervenir en la dinámica del calcio, ya sea aumentando o disminuyendo la señal de dicho mineral (Simpson y col., 1995).

➤ Contracción muscular: En el músculo, la concentración intracelular de calcio está regulada por proteínas específicas, que se activan ante la presencia de este ión. Es el caso de la troponina C. Otras proteínas como la calmodulina, que se localiza principalmente en el cerebro y el corazón, son reguladoras de la transducción de la señal de calcio en la célula. A concentraciones superiores a 1 μM , el calcio se une a la calmodulina provocando un cambio de conformación que supone una rotación de la molécula y la exposición al exterior de grupos hidrófobos que permiten que la calmodulina se pueda unir a otras proteínas. Este cambio conformacional, permite su unión con la fosforilasa quinasa, activando la glucólisis y permitiendo así, la sincronización de la contracción muscular, al presentar una estructura similar a la troponina C (Martínez y Suárez, 2010).

Introducción

➤ Cofactor en el proceso de coagulación: El calcio es el factor IV de la cascada de reacciones de la coagulación, favoreciendo la unión de los factores IX (antihemolítico B), X (Stuart-Prower), VII (proconvertina) y I (protrombina) y su fijación a los fosfolípidos de membrana. Estos complejos producirán la conversión de la protombina en trombina (Mann y Cummings, 2009).

1.2.3. INGESTA DE CALCIO RECOMENDADA

Los cambios que se han producido en la sociedad en las últimas décadas y la mayor longevidad de la población han ido produciendo cambios en la alimentación que conllevan a veces deficiencias nutricionales. Para evitarlas, las organizaciones sanitarias internacionales han creado diferentes guías donde figuran las ingestas óptimas para los diferentes nutrientes. Son las conocidas como Ingesta Diaria Recomendada (IDR) o RDA (del término anglosajón de Recommended Dietary Allowances) (Ingestas Dietéticas de Referencia Definiciones, 2007).

Estas recomendaciones se recogen en tablas elaboradas en base a los resultados obtenidos en estudios realizados con una amplia población y durante un tiempo lo suficientemente largo como para poder establecer cuáles son las necesidades reales. Posteriormente, estos datos son recogidos por la legislación de cada país. Así, tanto la Unión Europea, a través de la Directiva Europea 2008/100/EC (Parlamento Europeo, 2008), como el Instituto de Medicina (IOM) de los Estados Unidos (2010), reflejaron la ingesta diaria de calcio recomendada en base a los grupos poblacionales o el estado fisiológico de los individuos.

En España, en el anexo del Real Decreto 930/1992 de 17 de julio, por el que se aprueba la Norma de etiquetado sobre propiedades nutritivas de los productos alimenticios modificado por el Real Decreto 1669/2009 de 6 de noviembre, se establecen los nutrientes que pueden declararse en el etiquetado así como la IDR de cada uno de ellos. En dicho reglamento queda indicado que la IDR del calcio es de 800 mg/día.

Para la determinación de la IDR se admite que la digestión, la absorción y el metabolismo, son normales. Las dosis recomendadas varían en función del sexo y la edad de los individuos, teniendo también en cuenta situaciones fisiológicas especiales como el embarazo, la lactancia, el desarrollo infantil o la menopausia, en las que la ingesta debe ser superior (Heaney, 2000; Miller y col., 2001; Zemel, 2001; McCarrom y

Introducción

Heaney, 2004; Unruh y col., 2004).

Así pues, teniendo en cuenta las anteriores consideraciones, nos encontramos con las siguientes recomendaciones:

➤ **Gestación y lactancia:** Durante la lactancia, existe una resorción del calcio en los huesos de la madre y pasará a la leche materna para ser transmitida al bebé; Durante estas dos etapas fisiológicas, el IOM (2010) determina que la IDR debe ser de 1000 a 1300 mg calcio/día, y según el Parlamento Europeo en la Directiva Europea 2008/100/EC, de 1200 mg/día.

➤ **Lactantes y jóvenes:** Las recomendaciones que deben reunir las fórmulas infantiles destinadas a lactantes fueron establecidas ya en 1998 por el Comité de Nutrición de la Asociación Americana de Pediatría (AAP), el Comité Científico de Alimentación de la Comisión Europea (SCF, 2003) y el de la Sociedad Europea de Gastroenterología, Hepatología y Nutrición Pediátrica (ESPGHAN) (Koletzko y col., 2005). Estos organismos recomiendan una ingesta mínima de calcio de 50 mg/100 Kcal por parte del AAP y la ESPGHAN y de 45 mg/100 Kcal por la SCF. Según las recomendaciones del IOM (2010), la IDR para lactantes es de 400 mg/día durante los 6 primeros meses de vida, 600 mg/día son suficientes para los 6 meses siguientes y 800 mg/día desde un año hasta los 10 y 1200mg/día para edades comprendidas entre 11 y 24 años. Por el contrario, según la Directiva 2008/100/EC del Parlamento Europeo, el grupo considerado como lactantes y jóvenes, necesita 700 mg/día.

➤ **Adultos:** Para los individuos sanos y en edad adulta, sin especificar la edad, en la Unión Europea se recomienda una IDR de 800 mg/día (Parlamento Europeo, Directiva 2008/100/CE), cantidades que se pueden alcanzar si se realiza una dieta equilibrada. El Instituto de Medicina (IOM, 2010) la establece en 1000 mg/día para individuos comprendidos entre 19-50 años, hombres o mujeres.

➤ **Mujeres posmenopáusicas y mayores de 65 años:** La incidencia de enfermedades relacionadas con déficits de calcio (osteoporosis y osteopenia) ha aumentado de forma considerable con la esperanza de vida, siendo mayor el número de casos en mujeres mayores de 65 años como consecuencia de la falta de estrógenos (Rachner y col., 2011). IOM (2010) recomienda una IDR de 1200 mg calcio/día mientras que la UE no recoge este grupo de población, indicando que la IDR de calcio es de 700 mg/día para hombres y mujeres de más de 18 años.

1.2.4. DÉFICITS Y EXCESOS DE CALCIO: RIESGOS PARA LA SALUD.

El sistema óseo es el principal reservorio de calcio. La mayor parte se acumula aproximadamente hasta los 20 años de edad, aunque continúa depositándose, pero de una forma más lenta, hasta la tercera década de vida. A partir de los 50 años empieza a reducirse la masa ósea al disminuir la densidad de los huesos, siendo mucho más intenso en el caso de las mujeres; en el hombre se observa más tarde, unos 10 años después. Esto ocasiona un riesgo de fracturas, que es menor en personas que hayan alcanzado unos niveles de masas óseas mayores en el punto de máxima mineralización. Este máximo está estrechamente relacionado con la ingesta de calcio sobre todo en la edad de crecimiento en la que la leche y los derivados lácteos constituyen un elemento básico en la dieta (Moreno, 2000).

Las deficiencias de calcio pueden causar diferentes enfermedades:

➤ **Osteoporosis:** se define como *cualquier grado de fragilidad del sistema óseo, suficiente como para aumentar el riesgo de fractura debido a un descenso en la masa ósea* (Heany, 2000; 2009).

En el año 2000, un estudio de la Organización Mundial de la Salud (OMS, 2000) indicó que más de 75 millones de personas en Europa, Japón y EEUU padecían esta enfermedad. En el 2008, la National Osteoporosis Foundation determinó que 10 millones padecían esa enfermedad, 80% de los casos eran mujeres a partir de los 50 años y el 20% restante, hombres y que 34 millones presentaban riesgo de padecerla debido a la pérdida de masa ósea.

Esta enfermedad se considera una de las de mayor impacto en la sociedad (González, 2000; Heany, 2009) y una de las más frecuentes e importantes causas de fracturas óseas en la tercera edad (Heany y Weaver, 2005). Su aparición en las mujeres se debe al descenso de los niveles de estrógenos. Hoy en día se sabe que compuestos procedentes de la soja (genisteína y daidzeína) pueden reducir este efecto y mantener los niveles de calcio óseo ya que de su hidrólisis, se forman compuestos como el equol caracterizado por su similitud en la respuesta estrogénica (Cotter y Cashman, 2005; Jewell y col., 2005; Raimondi y col., 2009).

Para evitar la osteoporosis, la nutrición juega un papel esencial, ya que una dieta adecuada junto con la realización de ejercicio físico puede reducir el riesgo de esta

Introducción

enfermedad en hasta un 50% (Chapuy y col., 1992; Dawson-Hughes y col. 1997 y Heany, 2009).

➤ **Osteopenia:** es la fase previa de la osteoporosis y de la misma forma, su aparición se asocia a una pérdida de estrógenos, por lo que es más frecuente en mujeres de más de 50 años (Cashman, 2002).

En España, presentan osteopenia cerca de tres millones de personas, de las cuales, 2,5 millones son mujeres. El 80% de las afectadas no es consciente de los factores de riesgo antes de que se les diagnostique y sólo el 10% de las mujeres con osteoporosis, reciben tratamiento según la FHOEMO (Fundación Hispana de Osteoporosis y Enfermedades Metabólicas Óseas) (Álvarez, 2002). Aunque el grupo de mayor riesgo de fracturas óseas son las personas con osteoporosis, se ha observado que aquellas con osteopenia también lo tienen, e incluso el National Osteoporosis Risk Assessment Study (Khosla y Melton, 2007) registró un mayor número de fracturas en el grupo con osteopenia que en el de osteoporosis. Hoy en día ambos grupos reciben el mismo tratamiento (Aronov, 2011).

➤ **Osteomalacia/raquitismo:** Es un fallo en la mineralización del sistema óseo. El término de osteomalacia es utilizado en personas de mediana edad mientras que en los niños, adquiere el nombre de raquitismo. Los individuos que padecen esta enfermedad presentan una cantidad normal de colágeno que da la estructura a los huesos, pero la mineralización es baja debido a un déficit de vitamina D, una disfunción de la misma o insuficiente exposición a la luz solar, aunque existen otros factores que pueden producir esta enfermedad como hereditarios, fallos renales, acidosis o enfermedades hepáticas (OMS, 2000).

El exceso de calcio puede tener también un efecto negativo en el organismo. Así, un aumento significativo de los niveles séricos resultan en una hipercalcemia, es decir, una mayor concentración del calcio en la orina. El exceso de calcio puede favorecer la formación de cristales, generalmente de oxalato o de fosfato en el riñón y/o vejiga, cuya agregación conduce a la formación de piedras (Rule y col, 2011). El cuadro se puede agravar si los niveles séricos son superiores a 14,5 mg/dl, lo cual conllevaría la aparición de una disfunción del sistema nervioso central, alteraciones cardiovasculares e incluso un fracaso renal severo (Nuevo-González, 2009). Por esta razón, es de vital importancia conocer la causa primaria que ha conllevado la aparición del exceso de

Introducción

calcio.

La hipercalcemia puede estar producida no solo por una ingesta alta y prolongada de calcio, sino por diferentes procesos patológicos como hipertiroidismo, insuficiencia renal, tuberculosis e intoxicaciones por vitaminas A y D o algunos tumores como el de mama entre otros (Nuevo-González, 2009). La hipercalcemia se ha asociado también con largos períodos de inmovilización que causan una atrofia muscular (Fairè y Frasquet, 1999).

1.3. BIODISPONIBILIDAD DEL CALCIO

1.3.1 Biodisponibilidad de nutrientes

Generalmente se acepta que, la biodisponibilidad de un nutriente es un fenómeno fisiológico que resulta ser la llave del concepto efectividad nutricional y que es independiente del tipo de alimento del que se trate, ya sea éste funcional o no (Fernández-García y col. 2009). Hoy en día se considera que el estudio de la bioaccesibilidad es fundamental para el establecimiento de las alegaciones de salud.

Existen distintas definiciones de biodisponibilidad. Ya en 1993, Fairweather-Tait la definió como *la fracción del nutriente ingerido que está disponible para su uso en diversas funciones fisiológicas o para su almacenaje*. Unos años más tarde, Schumann y col., en 1997 la definió como *una fracción de la dosis oral del compuesto que puede alcanzar la circulación sistémica*. Otros autores consideran que el término biodisponibilidad debe referirse exclusivamente a *la fracción de un nutriente que es absorbido* (Heany 2001). También se ha definido como *la disponibilidad del nutriente a ser absorbido, metabolizado, distribuido en los tejidos diana y empleado para su fin último* (Fernández-García y col., 2009). Más recientemente, el concepto de biodisponibilidad se ha referido a *la proporción de un nutriente que nuestro organismo absorbe de los alimentos y que utiliza para las funciones corporales normales* (Agget, 2010; Hurrell y Egli, 2010). Aunque las definiciones pueden variar, lo que sí está claro es que se refiere a la cantidad de un nutriente que utiliza, almacena o excreta el organismo.

Hoy en día se admite que el concepto de biodisponibilidad engloba a su vez otros dos conceptos: la bioaccesibilidad y la bioactividad.

La *bioaccesibilidad* se define como la fracción de un compuesto que es liberada de la matriz de la que procede y que queda disponible para ser absorbida intestinalmente. Este término incluye todos los procesos que tienen lugar durante la digestión, durante la que se liberan los distintos componentes de los alimentos, se transforman y pueden ser absorbidos a nivel intestinal (Duchateau y Klaffke, 2009; Fernández-García y col., 2009).

La *bioactividad* se refiere a la cantidad del nutriente que llega al órgano diana y puede ejercer su función. (Vaisberg y col., 2006).

Introducción

Para que un nutriente se absorba y ejerza su función, debe pasar por varias etapas (Holst y Williamson, 2008; Agget, 2010):

- Su liberación a partir la matriz alimentaria.
- Ser resistente a la actividad de las enzimas digestivas.
- Convertirse, si es necesario, en una forma química apta para atravesar la barrera intestinal.
- El paso del nutriente por la pared intestinal.
- Llegada a la circulación sistémica y su distribución.
- Su llegada al órgano diana.
- Su utilización a nivel metabólico y funcional.

Todo este proceso complejo se rige por factores extrínsecos o dietéticos e intrínsecos o fisiológicos. Entre los primeros se incluye el tipo y la complejidad estructural de la matriz alimentaria y la forma química en la que se encuentra el nutriente, su solubilidad y la posible competencia con otros nutrientes por su absorción a nivel intestinal. Un ejemplo de competición por el mismo sistema de utilización es la interacción entre el calcio y el hierro no hemo. Ambos minerales se unen a un agente transportador en la superficie de las células intestinales pero, mientras que el hierro no hemo entra así en las células, el calcio se queda a las puertas e impide que entre más hierro. Este efecto es relevante principalmente cuando se toman suplementos de calcio o hierro fuera de las comidas (Gibson, 2007).

El sexo, la edad y el estado nutricional del individuo son algunos de los factores intrínsecos o fisiológicos que pueden influir, pero quizá el más importante es el correcto funcionamiento del intestino y sus cambios a lo largo de la vida, debidos al deterioro funcional de la mucosa como ocurre en ancianos o en personas con infecciones inflamatorias en los que se pueden reducir la capacidad de absorción del intestino. En los cambios de estado fisiológico, como el embarazo, el organismo puede responder incrementando la vía de absorción del nutriente, es el caso del calcio, o su utilización para satisfacer la mayor demanda (Gibson, 2007; Lynch, 2007).

Introducción

La biodisponibilidad de los macronutrientes (carbohidratos, proteínas y grasas) suele ser muy elevada, llegando a superar el 90% de la cantidad ingerida. Sin embargo, en el caso de los micronutrientes, como las vitaminas y los minerales hay grandes diferencias ya que es fácil que los éstos interactúen con otros componentes de la alimentación, lo que produce un cambio en la biodisponibilidad.

No obstante, existen potenciadores de la biodisponibilidad que pueden actuar de formas diferentes, manteniendo el nutriente soluble o protegiéndolo de la interacción con los inhibidores (Van HetHof y col., 2000).

1.3.2. MÉTODOS

La mejor forma de estimar la biodisponibilidad de un nutriente es ver su efecto sobre el estado nutricional mediante biomarcadores, pero no siempre es posible disponer de ellos y a veces no son fáciles de evaluar. Por ello la biodisponibilidad puede determinarse, de forma indirecta a través de métodos *in vivo* e *in vitro*.

MÉTODOS IN VIVO

Los métodos *in vivo* son los más adecuados para el estudio de cualquier compuesto bioactivo. Se basan en modelos animales y pruebas de intervención en humanos y se consideran los más importantes ya que se acercan más a la realidad, a lo que le ocurre a un determinado nutriente tras su ingesta con la dieta.

Los principales inconvenientes descritos para los ensayos en humanos son, además del elevado coste y las consideraciones éticas, el efecto de múltiples variables dependientes de la propia variabilidad metabólica del individuo, de factores genéticos y sobre todo, la posible influencia de componentes de los alimentos que se ingieren junto con el nutriente (Fernández-García y col., 2009).

Los ensayos *in vivo* con animales se configuran como otro de los ensayos más interesantes. Las especies más empleadas en investigación son ratas, cerdos, cobayas y en contadas ocasiones, primates. Los cerdos son animales omnívoros que comen dos a tres veces al día. Su aparato digestivo es muy similar al de los humanos, por lo que suele ser un buen modelo. Las ratas y cobayas se alimentan a base de granos por lo que su intestino presenta elevados niveles de fitasa que se une a los hidrolizados de fitato y disminuyen la absorción del calcio en el intestino delgado. Tanto los ratones como las cobayas, a su vez, son coprófagos, por lo que el estudio de los resultados resulta

Introducción

complicado. Si el estudio del calcio se centra en la resorción ósea, las ratas son los modelos más apropiados, ya que su equilibrio óseo presenta un comportamiento similar al que poseen los humanos. Los suidos y los ratones eliminan muy poca cantidad de calcio por orina, al contrario de las cobayas y los humanos en los que son bastante elevados. Este hecho, limita la elección de los suidos como modelo animal para el estudio de los factores que influyen en la excreción urinaria del calcio. A pesar de las diferencias comentadas, los ratones son mucho más utilizados que los cerdos simplemente por razones de disponibilidad y facilidad de manejo en laboratorio (Jabr y Fry, 2013).

También permite elaborar grupos de animales uniformes con pequeñas variaciones individuales, ya que la raza, la especie, el género, edad, peso, estado fisiológico y dieta son factores fáciles de controlar. Por ello, un número de aproximadamente 10 animales permite analizar diferencias significativas en los resultados obtenidos de igual manera que con un ensayo realizado con cientos de voluntarios (Guéguen y Pointillart, 2000; Frontela, 2007). Igualmente, las consideraciones éticas son también muy importantes en ensayos realizados con animales y a veces constituyen una barrera importante a la hora de plantear este tipo de estudios.

La metodología utilizada para determinar la biodisponibilidad *in vivo* se basa fundamentalmente en estudiar el balance químico de un nutriente. El primero de ellos consiste en evaluar la diferencia entre la cantidad ingerida y la excretada por vía fecal y urinaria durante un cierto periodo de tiempo con la finalidad de determinar si el balance es positivo ó negativo (Cámara-Martos y Amaro-López, 2004). Este método se ha aplicado en numerosos estudios pero presenta inconvenientes importantes como es la no diferenciación entre por ejemplo, el mineral no absorbido de origen dietético y el procedente de la excreción endógena. Por otra parte, es un método con limitaciones en el caso de los elementos traza y en aquellos otros cuya secreción endógena es importante y resulta complicado eliminar la influencia de los factores intrínsecos por lo que, a veces, es difícil extrapolar los resultados obtenidos en un grupo de individuos a otro por sus particularidades metabólicas (Fernández-García y col., 2009).

MÉTODOS *IN VITRO*

Los ensayos *in vitro* no están sujetos a estos problemas éticos. Son métodos indicativos, fácilmente reproducibles y útiles para tener una primera impresión sobre el proceso digestivo y la absorción del nutriente. Sin embargo, presentan algunas limitaciones basadas, fundamentalmente, en la dificultad en alcanzar la composición adecuada del quimo y la motilidad intestinal. No hay que olvidar que el tiempo de estancia en cada una de las partes del intestino es fundamental para la absorción de nutrientes (Venema y col., 2009).

Estos ensayos comenzaron a generalizarse desde finales del siglo pasado hasta la actualidad, como los realizados por Bosscher y col., (2001); Bosscher y col., (2002); De Souza-Nogueira y col., (2004); Cámara y col., (2005). Su evolución ha hecho que la metodología sea cada vez más precisa, de tal forma que los resultados obtenidos en este tipo de pruebas, son cada vez más extrapolables a los obtenidos en ensayos *in vivo*, convirtiéndose así en una buena alternativa para el estudio de la bioaccesibilidad de nutrientes (Frontela, 2007).

Hay cuatro métodos *in vitro* para medir la bioaccesibilidad de un nutriente: solubilidad, dializabilidad (estáticos), un modelo gastrointestinal dinámico y el uso de líneas celulares específicas.

Los estudios *in vitro* comienzan siempre simulando el proceso de digestión gastrointestinal del alimento a estudiar, utilizando secuencialmente soluciones salinas (saliva), enzimas digestivas, cofactores, co-enzimas, sales biliares y otros componentes específicos, en proporciones muy próximas a las que se encuentran en el tracto gastrointestinal, permitiendo así simular las fases de digestión gástrica e intestinal. Las condiciones de pH, temperatura y agitación se controlan simulando en la medida de lo posible las condiciones del cuerpo humano y la motilidad intestinal.

Para el ensayo de solubilidad, se centrifuga el digerido gastrointestinal. Los nutrientes o compuestos presentes en el sobrenadante representan los componentes solubles. Se calcula el porcentaje de solubilidad como la cantidad de compuesto soluble con relación a la cantidad total de compuesto en la muestra de ensayo.

Introducción

Los ensayos de dializabilidad se introdujeron en 1981 por Miller y col. En su estudio, determinaron el hierro absorbido mediante un proceso de diálisis que simulaba el paso a través del endotelio intestinal. El modelo supone el uso de un tubo o bolsa de diálisis con un determinado tamaño de poro en cuyo interior se deposita un tampón, tal como bicarbonato de sodio, que se difunde lentamente fuera de la bolsa a la vez que el nutriente a estudiar difunde hacia el interior. Evidentemente, la premisa de los métodos de dializabilidad es que los compuestos dializable estarán disponibles para la absorción en el intestino delgado. Este método ha sido aplicado y adaptado para estudiar la bioaccesibilidad de un número de micronutrientes como el calcio, zinc, y magnesio, entre otros. Una extensión de este método implica el sistema de diálisis de flujo continuo que conlleva a la eliminación de componentes dializables en cuenta que conduce probablemente a una mejor estimación de la biodisponibilidad *in vivo* (Etcheverry y col., 2012).

Sin embargo, este tipo de métodos presentan varias desventajas, tales como la validación frente a los resultados obtenidos en ensayos *in vivo*, la dinámica del tracto gastrointestinal no es completamente reproducible con ensayos bioquímicos o con cultivos celulares y no consideran el efecto de la microbiota intestinal así como del metabolismo hepático (Fernández-García y col., 2009).

Los métodos de digestión *in vitro* dinámicos, son aquellos que incluyen una serie de movimientos de la muestra que simulan los peristálticos. Además, están asociados con un sistema informático que permite controlar la dosificación de los jugos gástricos e intestinales y un mejor control del pH. Los métodos dinámicos presentan la ventaja de ser métodos rápidos, reproducibles, no tienen limitaciones éticas y permiten la toma de muestras en cualquier parte del tracto gastrointestinal (Ribnicky y col., 2014).

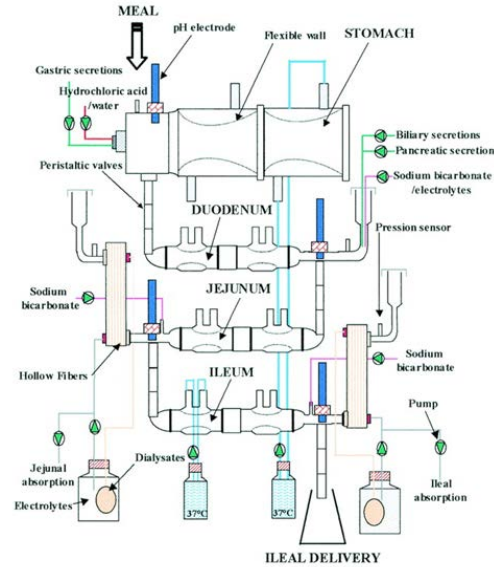
El modelo dinámico más importante es el sistema TIM que consta de dos equipos, el digestor TIM-1 que simula el estómago y el intestino delgado y el TIM-2 que simula el intestino grueso.

El equipo se compone de cuatro compartimentos sucesivos que simulan el estómago, duodeno, yeyuno e íleon unidos por tubos ensamblados en forma de T (Figura 5). Cada uno de los compartimentos está formado por un tubo de vidrio con una camisa o pared interior de un material flexible por el que circula agua caliente que

Introducción

permite controlar la temperatura a 37°C. La presión a la que se bombea el agua permite la mezcla del quimo simulando así los movimientos peristálticos.

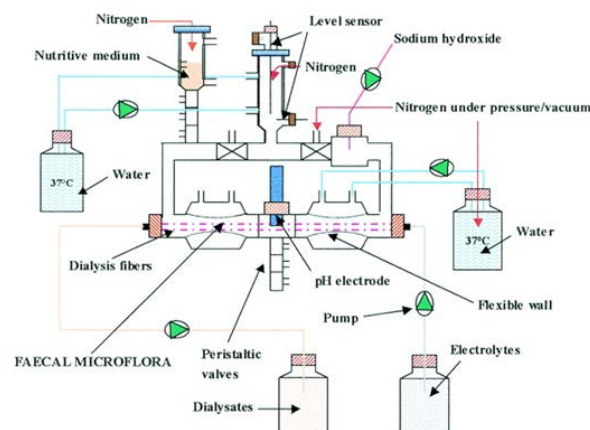
Figura 5: Diagrama del sistema TIM 1 (TNO, Zeist, Holanda)



Se van tomando muestras a lo largo del proceso y se determinan en cada fase la fracción bioaccesible. Al final queda un residuo que se corresponde a la cantidad de mineral que se excretaría por heces (Venema y col., 2009).

El TIM-2 es un colon artificial que permite simular las condiciones que se producen en el intestino grueso y determinar la actividad de los compuestos bioactivos tras pasar por el tracto intestinal y la relación entre el nutriente y la microbiota intestinal. La Figura 6 muestra un esquema del equipo.

Figura 6: Diagrama del sistema TIM 2 (TNO, Zeist, Holanda)



Introducción

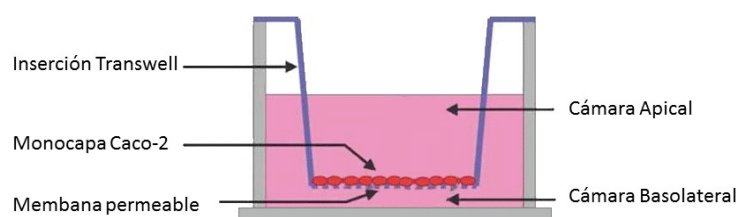
Se compone de cuatro compartimentos de vidrio, similares a los del TIM 1, cada uno de ellos con una pared flexible en su interior y conectados todos entre sí. Recibe las muestras procedentes del TIM-1; posteriormente el digerido se recoge para ser analizado. La cantidad de quimo se controla con un sensor de presión y se mantiene a un nivel establecido previamente gracias al bombeo de agua en el circuito de diálisis. (Venema y col., 1999).

Lo más importante del modelo TIM-2 es que permite inocular una microbiota estandarizada, por lo que se puede evaluar su influencia sobre los compuestos bioactivos (Venema y col., 2009).

Hoy en día se consideran mucho más precisos los estudios realizados con cultivos celulares. Los primeros trabajos realizados en este sentido fueron con células aisladas de la mucosa intestinal, pero su estudio no tuvo resultados muy relevantes; otros autores como Raul y col., (1978) intentaron hacer lo mismo pero utilizando líneas basadas en enterocitos, pero el éxito fue tan reducido como en el caso anterior. Sin embargo, el empleo de células procedentes de adenocarcinoma humano obtuvo resultados más satisfactorios. Este método *in vitro* se combina siempre con una digestión gastrointestinal previa y son las células las que reciben la fase intestinal y simulan la absorción de nutrientes (Álvarez-Hernández y col., 1991; Fairweather-Tait y col., 1993; Han y col., 1994; Glahn y col., 1998; Perales y col., 2005; Cilla y col., 2011).

La línea celular Caco-2, que fue descrita inicialmente por Fogh y col. (1977), procede del adenocarcinoma de colon humano y tiene la capacidad de diferenciarse fácilmente en placas de policarbonato con unas características morfológicas y funcionales, similares a las de los enterocitos del intestino delgado humano (Hidalgo y col., 1989; Wilson y col., 1990; Sambuy y col., 2005). De ahí, que en los últimos años, sea considerada como la mejor línea celular para estudios de esta naturaleza.

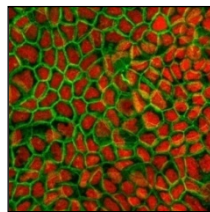
Figura 7: Esquema de la monocapa de células Caco-2 (Valenzuela y col., 2003).



Introducción

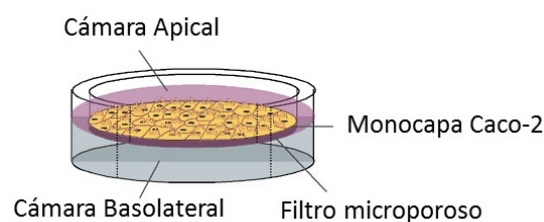
Las células Caco-2 forman una monocapa que se diferencia a los 12-21 días post-inoculación y cuando éstas alcanzan la confluencia, se diferencian espontáneamente adquiriendo las características morfofuncionales de los enterocitos maduros (Herold y col., 1994). A nivel morfológico se caracterizan por presentar uniones entre sí y microvellosidades. Igualmente, producen las enzimas necesarias para el transporte de nutrientes como las peptidasas, esterasas, y glicoproteínas, entre otras (Delie y Rubas, 1997).

Figura 8: Análisis confocal de las paredes celulares de la línea Caco 2.
CacoReady™: http://www.cacoready.com/graf/por_0102_2.gif



Una vez diferenciadas, las células quedan polarizadas, con uniones intercelulares, con una membrana apical bien diferenciada, con buena actividad enzimática (sacarasa-isomaltasa, fosfatasa alcalina, lactasa y aminopeptidasa) (Lind, 2003) y una membrana basolateral con una actividad ATP-asa ($\text{Na}^+\text{-K}^+$) y receptores hormonales (Viadel, 2002).

Figura 9: Representación esquemática de la monocapa de Caco-2, en un sistema polarizado “transwell”. http://www.cacoready.com/graf/por_0102_2.gif



Uno de los principales problemas de esta línea celular es su propia diferenciación ya que, si no es uniforme, las células presentarán un metabolismo diferente entre sí, afectando a su capacidad de transporte de nutrientes o también podrá verse afectada la resistencia transepitelial de la membrana.

Son varias las desventajas que se han descrito para estos cultivos celulares. La

Introducción

más importante es que, debido su origen, son incapaces de producir mucinas, proteínas secretadas por los enterocitos y cuya función principal es la de atrapar microorganismos patógenos (Midura y Hascall, 1996; Martín y col., 2007). Otra desventaja es que, al estar crecidas en una placa de policarbonato, la superficie de transporte es menor que en el intestino humano y, finalmente, que carecen de la regulación endocrina a la que están sometidos los enterocitos humanos (Sambuy y col., 2005; Frontela, 2007).

La principal ventaja que presentan estas células es que permiten trabajar con condiciones estandarizadas y los resultados pueden, en consecuencia, ser reproducibles (Gangloff y col., 1996; Sambuy y col., 2005). Otra de las ventajas es que es la única línea celular de origen humano que tiene receptores para la vitamina D cuando se encuentran en estado diferenciado, lo cual puede estimular de un modo significativo el transporte transepitelial de nutrientes, entre los que se encuentra el calcio (Fleet y col., 1996; Sambuy y col., 2005).

1.3.3. ABSORCIÓN DE CALCIO

La mayoría del calcio se absorbe principalmente en el intestino delgado y por dos vías, una transcelular, a través de las células epiteliales, y otra paracelular, la más frecuente, y que se realiza a través de las uniones intercelulares (Ekmekcioglu y col., 2002; Jewelly col., 2005). Que tenga lugar una vía u otra, depende de la concentración que llegue al intestino. Una pequeña fracción de calcio se puede absorber en el colon.

La vía transcelular es un transporte activo que está regulado por la vitamina D y tiene lugar en duodeno y yeyuno donde el menor valor de pH favorece su absorción. La vía paracelular es un transporte pasivo (difusión) que tiene lugar a lo largo de todo el intestino delgado y en este caso, la absorción depende de la concentración de calcio en el lumen intestinal.

Cuando la ingesta de calcio es alta, predomina el transporte pasivo, mientras que predomina el activo cuando es baja o cuando las necesidades aumentan, como en el embarazo y la lactancia. Así, se observa una mayor absorción en aquellas personas adaptadas a bajos aportes de calcio (≈ 300 mg/día) que en aquellas personas que ingieren cantidades altas (≈ 2000 mg/día). Sin embargo, si la ingesta es excesiva, aunque aumenta la cantidad que se absorbe de forma pasiva, la absorción total disminuye, debido a la saturación del transporte activo (Rovira y Pons, 1999).

Introducción

La absorción de calcio varía de unos individuos a otros de tal forma que puede oscilar entre un 10 - 60% (Rovira y Pons, 1999), aunque en los últimos años se ha estipulado que el mismo está en torno a un 30% (National Institute of Health, 2013).

1.3.4. INTERACCIONES E INFLUENCIA DE FACTORES DIETÉTICOS EN LA ABSORCIÓN DEL CALCIO

La composición de la dieta, la proporción en la que se encuentran los macro y micronutrientes, entre los que están los minerales, la composición de las matrices alimentarias y la forma química en la que se encuentre el nutriente (libre, ionizado, en forma de sales solubles), son los factores más importantes a tener en cuenta en la absorción de nutrientes.

En el caso del calcio, componentes de la dieta como la fibra, el ácido urónico, la celulosa, el ácido fítico y el ácido oxálico favorecen la formación de compuestos insolubles con el calcio, limitando su absorción. Los oxalatos de los vegetales disminuyen la biodisponibilidad del calcio, llegando a absorberse tan solo el 5%; de hecho, es superior en aquellas frutas y verduras con menor contenido en oxalatos, pudiéndose absorber hasta un 41% (Nabrzyski, 2002; Charoenkiatkul y col., 2008). Dendougui y Schewedt (2004), al estudiar diversos alimentos como el arroz y las semillas de soja y observaron que la absorción de calcio no excede el 10%, debido a los complejos que los fosfatos formaban con el calcio a pH alcalino (pH del intestino), que evitan su absorción.

Se ha descrito una relación directa entre la absorción de calcio y la ingesta de ácidos grasos poliinsaturados (ácido linoleico) ya que modulan los niveles sanguíneos de los factores de crecimiento que a su vez favorecen el paso del calcio a través de la membrana (vía transcelular) y, en consecuencia, su absorción intestinal (Kelly y col., 2003; Yassimi y col., 2008).

Otros compuestos que favorecen la absorción de calcio son los fructo-oligosacáridos. La microbiota del colon fermenta esta fibra soluble (Ohta y col., 1995) favoreciendo la formación de ácidos como málico o láctico que descienden el pH, pueden formar complejos solubles con el calcio mejorando su absorción (Perales y col., 2005) o estimulando el crecimiento bacteriano con el aumento de la producción de fitasas endógenas. Hoy en día se reconoce que el consumo de determinados probióticos puede favorecer igualmente, la absorción del calcio al provocar también un

Introducción

descenso del pH intestinal (Scholz-Ahrens y col., 2001; Scholz-Ahrens y Scherezenmeir, 2002; Cashman, 2003; Scholz-Ahrens y col., 2007). Durante los procesos fermentativos que generan, se liberan al medio ácidos grasos de cadena corta que hacen descender el pH, aumenta así la ionización del calcio y resulta mucho más fácil la difusión pasiva a través de la membrana celular (Roberfroid y Slavin, 2000; (Amaro y Cámara, 2004 Gilman y Cashman, 2006; Martín y col. 2007).

La leche y los derivados lácteos son los alimentos de referencia sobre la absorción del calcio. Las proteínas presentes en la leche, como la caseína, actúan ligando cationes divalentes y trivalentes mediante enlaces iónicos (Amaro y Cámara, 2004 y Teucher y col., 2006). La lactosa, los caseinofosfopéptidos y los fosfolípidos, durante la digestión permiten mantener al calcio en forma soluble al pH intestinal, donde será absorbido (Jovani y col., 2001; Cámara-Martos y Amaro-López, 2002; Hartmann y Meisel, 2002; Perales y col., 2005; Miquel y col., 2006).

La excreción de calcio a través de la orina también está influenciada por diferentes parámetros y así, una excesiva ingesta de proteínas, alcohol, cafeína o de sodio, incrementan la calciuria (Korstanje y Hoeck, 2001).

1.4. ALIMENTOS FUNCIONALES

El término de “alimento funcional” surgió por primera vez en Japón en la década de los 80, y ya se hablaba de ellos como *productos fortificados con un compuesto especial que poseen ventajas fisiológicas* (Hardy, 2000; Kwak y Jukes, 2001; Stanton y col., 2005). En 1991, el Ministerio de Salud introdujo normativas para aprobar una categoría de alimentos especializados en salud denominada FOSHU (Food for Specidfied Health Uses), la cual dio lugar a lo que ahora conocemos como alimentos funcionales (Roberfroid, 2000; Kwak y Jukes, 2001; Menrad, 2003; Burdock y col., 2006).

Esta corriente se extendió rápidamente por Europa y Estados Unidos y ha avanzado tanto que hoy en día las autoridades sanitarias apoyan el consumo de alimentos funcionales y a las industrias alimentarias a su fabricación (Olmedilla-Alonso y Jimenez-Colmenero, 2014).

En 1996, se desarrolló la Acción Concertada FUFOSE (Functional Food Science in Europe) coordinada por el Internacional Life Sciences Institute (ILSI) y en ella, se alcanzó de forma consensuada la siguiente definición: *Un alimento puede ser denominado alimento funcional si se demuestra de forma satisfactoria que afecta de forma beneficiosa a una o más funciones del organismo, más allá de los efectos nutricionales propias, de manera que sea relevante para ellos mejorar el estado de salud y/o disminuir el riesgo de enfermedad.* Así mismo se estableció que para que un alimento se pueda considerar como funcional debe ser eso, un alimento, que no se trata de un medicamento ni complemento dietético, sino parte de un patrón normal de alimentación y demostrar sus efectos beneficiosos en cantidades en las que se consuma de forma habitual en una dieta (Diplock y col., 1999). Más recientemente, en 2007, el Food Quality and Standards Service (AGNS) y Food and Agriculture Organization of the United Nations (FAO); define los alimentos funcionales como *aquellos alimentos en apariencia similares a los alimentos convencionales, y venir ingerido/tomados dentro de una dieta variada que incluya principios biológicamente activos con efectos beneficiosos fisiológicos demostrados y que ofrezcan la posibilidad de reducir el riesgo de patologías crónicas, además de las funciones nutricionales básicas, así como los principios activos que tienen que ser componentes naturales presentes en los alimentos o añadidos.*

Hoy en día, los nuevos estilos de vida han influido en la evolución del campo de la nutrición, de tal forma, que los alimentos pueden ser utilizados para prevenir

enfermedades o deficiencias en diferentes nutrientes, permitiendo alcanzar con una mayor facilidad una dieta equilibrada y óptima (Milner, 2000), que asegure el bienestar y salud del ser humano, junto con una reducción en la prevalencia de determinadas enfermedades (Roberfroid, 2002). El desarrollo de estos productos se está viendo incrementado en los últimos años en sectores demográficos como la población de la tercera edad (Mark- Herbert, 2004; Menrad, 2003; Side, 2006).

1.4.1. PRINCIPALES INGREDIENTES FUNCIONALES

El diseño de un alimento funcional es complejo. En primer lugar hay que tener en cuenta cual es el efecto fisiológico que estamos buscando y en consecuencia, cual es el componente que queremos adicionar, eliminar o modificar. El objetivo propuesto se puede alcanzar por varias vías (Palou y Serra, 2000; Ashwell, 2002):

- Eliminación de algún componente que se encuentre de forma natural en el alimento pero que puede causar algún perjuicio al consumidor, por ejemplo grasa, proteínas del gluten o colesterol.
- Adición o modificación de la cantidad de un componente presente en el alimento. Sería la adición de calcio a la leche o de ácido fólico a los cereales del desayuno.
- Sustitución de un componente por otro. Son los sustitutos de grasa o azúcar en los alimentos hipocalóricos o de sal común en los hiposódicos.
- Alteración de la biodisponibilidad. Un ejemplo muy claro de este grupo son los fitoesteroles que disminuyen la biodisponibilidad del colesterol.

Son muchos los compuestos bioactivos utilizados para elaborar alimentos funcionales; pasaremos a hacer algunas consideraciones sobre los más utilizados:

1.4.1.1. Probióticos, prebióticos y simbióticos:

➤ Probióticos:

El término de probiótico hace referencia a los microorganismos vivos que al ser ingeridos en cantidades adecuadas, tienen efectos beneficiosos para la salud (FAO/OMS, 2002). La mayoría son bacterias ácido lácticas y bifidobacterias (Vaughan y col., 2002) y generalmente, se ingieren con productos lácteos fermentados ya que son un medio óptimo de crecimiento (Reyes-Gavilán y col., 2015).

Introducción

La elección de un probiótico para un alimento debe tener en cuenta que su supervivencia a lo largo del tracto gastrointestinal y su antagonismo con otras bacterias entéricas (Shah, 2001; Jayamanne y Adams, 2006). *Lactobacillus casei* y *Bifidobacterium infantis* son de las especies más utilizadas en la industria alimentaria (Krishnakumar y Gordon, 2001; Reyes-Gavilán y col., 2015).

➤ **Prebióticos:**

Son compuestos caracterizados por ser fermentados en el colon produciendo compuestos que favorecen la absorción de nutrientes y la aparición o modificación de una microbiota colónica “saludable” (Fontecha, 2003).

La mayoría de los prebióticos utilizados son carbohidratos no digeribles, sobre todo los fructanos, que son fermentados para producir ácidos grasos de cadena corta como el acético, propiónico, butírico así como metano, CO₂ e hidrógeno. El consiguiente descenso del pH tiene, como hemos dicho previamente, un efecto positivo en la absorción de calcio (Charalampopoulos y Rastall, 2012). Además, se debe destacar su efecto anticancerígeno, su acción sobre el metabolismo del tracto gastrointestinal y la reducción de los niveles de LDL-colesterol (Charalampopoulos y Rastall, 2012). Además, se ha demostrado que, en presencia de prebióticos, se produce la fijación de las bacterias ácido lácticas o bifidobacterias a la mucosa intestinal lo que favorece la absorción de calcio (Tang y col., (2007).

La demanda de alimentos con prebióticos es cada día mayor siendo los fructooligosacáridos y galactooligosacáridos los más comercializados (Ouwehand, 2007). Uno de los ejemplos más importantes de productos elaborados con prebióticos son los cereales y sus derivados (Siró y col., 2008).

➤ **Simbióticos:**

Un simbiótico es un producto alimenticio que combina al menos un probiótico y un prebiótico (Homayouni y col., 2007). Si el carbohidrato es utilizado por el probiótico, proliferará de forma selectiva en el intestino y será más fácil su implantación en el colon. La combinación de un prebiótico con un probiótico en un mismo producto puede tener un efecto sinérgico y conferir beneficios mayores que los que ejercen cada uno de los componentes por separado (Langa, 2006).

Introducción

1.4.1.2. Vitaminas:

La pérdida de vitaminas es inherente al procesado de los alimentos, ya sea por la manipulación del producto en el momento de la recolección en el caso de las frutas y verduras, los tratamientos de conservación, principalmente térmicos o durante la preparación culinaria. Conscientes de ello y para evitar su déficit, los investigadores y las industrias cada vez lanzan al mercado más productos enriquecidos en vitaminas como leche y derivados y zumos de frutas. Mención especial hay que hacer a los derivados de los cereales cuyo enriquecimiento con ácido fólico, por ejemplo, ya fue recomendado en 1996 por la FDA (Benkouider, 2004).

1.4.1.3. Minerales:

Aparte del calcio, mineral objetivo de esta tesis, el hierro es uno de los minerales más empleados para el enriquecimiento de alimentos, debido a los problemas de salud asociados a su déficit. Así, por ejemplo se enriquecen con hierro productos derivados de cereales (Aleman y col., 2010) o fórmulas infantiles (Frontela y col., 2009).

También se han diseñado leches enriquecidas en zinc (Ruz y col., 2005), así como huevos (Plaismast y col., 2009). El selenio ha sido empleado para el enriquecimiento de productos cárnicos (Taylor y col., 2008; García-Iñíguez y col., 2010) y harinas (Hart y col., 2009). Otros productos enriquecidos con minerales son las denominadas bebidas “bonehealth”, con calcio e inulina (Keller, 2006); zumos enriquecidos con fósforo y calcio (Cilla y col., 2011) y leches enriquecidas con diferentes minerales (Romeo y col., 2011).

1.4.1.4. Fibra:

Los efectos beneficiosos asociados al consumo fibra son la mejora del tránsito intestinal, así como su papel como prebiótico, la reducción del colesterol (Cui y Roberts, 2009) y la reducción del desarrollo de enfermedades cardiovasculares y ciertos tipos de tumores (Mann y Cummings, 2009; Kendall y col., 2010). La fibra es un compuesto no-calórico con una alta capacidad de retención de agua que influye en la viscosidad de los alimentos convirtiéndose en un agente texturizante muy valorado. La fibra también se utiliza como sustituto de la grasa, aporta una lubricidad en boca y una textura que recuerda la presencia de grasa (Gelroth y Ranhotra, 2001); (Fuentes-Zaragoza y col., 2011).

Introducción

Los principales alimentos enriquecidos en fibras son los derivados de los cereales como el pan y los cereales de desayuno (Laurikainen y col., 1998). No obstante, también se han incorporado a pescados (Sánchez-Alonso y col., 2007), productos reestructurados a base de pescado (Borderías y col., 2005), productos cárnicos (García y col., 2002; Fernández-Ginés y col., 2003; Ricondo y Ayo, 2007; Calvo y col., 2008; Fernández y col., 2011) y leche y derivados lácteos como los helados (Regand y Goff, 2003; Lummela y col., 2009).

1.4.1.5. Antioxidantes:

Dentro del grupo de antioxidantes, cabe destacar los carotenoides extraídos de frutas y hortalizas que aportan un valor añadido a los alimentos en los que se incorporan. Por ejemplo, el licopeno, extraído del tomate, que se ha añadido como ingrediente funcional en diferentes tipos de productos cárnicos (Calvo y col., 2008). También cabe mencionar los extractos de té verde que se incorporan a diferentes tipos de bebidas (Yoshida y col., 1999) y la incorporación de antioxidantes naturales a productos cárnicos madurados como los indicados por García-Iñíguez y col. (2010).

1.4.1.6. Ácido grasos poliinsaturados n-3:

Una de las prácticas más habituales es la obtención de productos enriquecidos con ácidos grasos n-3 mediante su incorporación en la alimentación animal para obtener así huevos, leche y carnes funcionales (Moghadasian, 2008).

Los avances en la industria alimentaria han permitido en los últimos años la elaboración de productos cárnicos cocidos con dicho nutrientes (Cáceres y col., 2006, De Natale y col., 2012) y patés enriquecidos (Kirkhus y col., 2012), entre otros.

Otros productos enriquecidos con este compuesto son las leches fermentadas, productos lácteos (Korpela y col., 2006) y zumos de frutas (Devaraj y col., 2004), entre otros.

1.4.2. LEGISLACIÓN

La actual demanda de alimentos funcionales ha obligado a las autoridades sanitarias a establecer una legislación que los regule y controle, con el objetivo primordial de mantener al consumidor informado sobre las propiedades de los alimentos funcionales que tiene a su disposición. El etiquetado se convierte, por tanto,

Introducción

en una herramienta esencial de información. Ya en la década de los 90, el Nutrition Labeling and Education Act (NLEA) (Public Law 101-535, 1990) estableció que los alimentos debían presentar un etiquetado nutricional sólo cuando el efecto que declara esté probado científicamente (Milner, 2000).

El Codex Alimentarius en 1991 definió las declaraciones de salud *como cualquier representación que afirme, sugiera o implique que un alimento tiene ciertas características relacionadas con su origen, propiedades nutricionales, naturaleza, producción, procesado, composición o cualquier otra calidad* (Diplock y col., 1999). Esta definición ha sido y sigue siendo la más aceptada. Un poco más adelante, en 1997, el FDA Modernization Act (FDAMA) autorizó a los fabricantes a usar *declaraciones de salud solo si se basaban en declaraciones recientes, publicadas y autorizadas por los cuerpos científicos federales preestablecidos*. En este ámbito, en 1999 apareció la primera declaración autorizada por la FDAMA que relacionaba los cereales y la disminución del riesgo de enfermedades coronarias y cáncer (ADA Reports, 2004).

El Codex Alimentarius (1997) estableció cuatro categorías de alegaciones de salud (Diplock y col., 1999): Alegaciones relacionadas con recomendaciones dietéticas, Alegaciones del contenido en nutrientes, Comparativas del contenido en nutrientes y Los referentes al papel fisiológico de un nutriente

En 1999, el mismo Codex Alimentarius remodeló esta definición y propuso la definición de “alegación de funcional” como aquella que *describe el papel fisiológico de un nutriente en relación con el crecimiento, desarrollo y normal funcionamiento del organismo*. Para evitar los vacíos legales que experimentan las cuatro categorías anteriores, propuso otras dos nuevas: Alegación sobre mejora de función y Alegación sobre la reducción del riesgo de enfermedades.

La Unión Europea a través de la Acción Concertada FUFOS (European Commission Community Research, 2000) estableció un enfoque científico sobre las pruebas necesarias para respaldar los alimentos funcionales. En el informe se indica que “los alimentos funcionales deben presentarse en forma de alimentos normales y que sus efectos deben ser mostrados en las cantidades que normalmente se consumen en la dieta”. Así mismo, se establecieron criterios para evaluar la validez científica de las declaraciones de salud y proporcionar la base para la preparación de informes que respalden dichas declaraciones.

Introducción

En el 2002, la FDA clasificó estas declaraciones de salud en 4 categorías en base a sus evidencias científicas. En la primera de ellas, la categoría A, figura el nivel más alto de evidencias científicas; en la segunda B, estarían aquellas cuyo nivel científico sea moderado, es decir, aquellas en las cuales su evidencia científica no es concluyente y las categorías C y D corresponderían a los niveles bajos o muy bajos de las mismas (ADA Reports, 2004).

Para poner en práctica las conclusiones y principios del programa de FUFOS, se desarrolló una nueva Acción Concertada de la Comisión Europea (Process for the Assessment of Scientific Support for Claims on Foods, PASSCLAIM QLK1-2000-B6) contemplada en el 5º Programa Marco (2000-2005) (ILSI Europe, 2010). El objetivo de PASSCLAIM era establecer criterios comunes para evaluar las aportaciones científicas a la hora de solicitar las declaraciones de salud y proporcionar la base para la preparación de informes científicos que las respalden. Estableció que las declaraciones "funcionales de mejora" y las de "reducción de riesgo de enfermedades" deberían basarse en estudios bien planificados, mediante el uso de biomarcadores adecuadamente identificados, caracterizados y validados. Sin embargo, los resultados de esta acción no llegaron a implementarse de forma consistente y así, en el año 2003 este mismo organismo publicó una propuesta (Propuesta COM/2003/0424) para una nueva regulación referente a las declaraciones nutricionales y de salud en alimentos y suplementos dietéticos.

Ante los resquicios legales que seguían apareciendo con estas normativas y para dar respuesta a las demandas de transparencia entre el mercado y el consumidor, el Parlamento Europeo emitió el Reglamento 1924/2006 cuyo objetivo era establecer un marco definitivo de control sobre las declaraciones y las propiedades nutricionales. Este Reglamento será aplicado *a las declaraciones nutricionales y propiedades saludables efectuadas en las comunicaciones comerciales, ya sea en el etiquetado, la presentación o la publicidad de los alimentos que se suministran como tales al consumidor final.*

En este Reglamento se define "Declaración" como *cualquier mensaje o representación que no sea obligatorio con arreglo a la legislación comunitaria o nacional, incluida cualquier forma de representación pictórica, gráfica o simbólica, que afirme, sugiera o dé a entender que un alimento posee unas características específicas.* En el mismo, son contempladas las siguientes definiciones:

Introducción

- “Declaración nutricional”: cualquier declaración que afirme, sugiera o dé a entender que un alimento posee propiedades nutricionales beneficiosas específicas.
- “Declaración de propiedades saludables”: será cualquier declaración que afirme, sugiera o dé a entender que existe una relación entre una categoría de alimentos, un alimento o uno de sus constituyentes, y la salud.
- “Declaración de reducción del riesgo de enfermedad”: cualquier declaración que afirme, sugiera o dé a entender que el consumo de una categoría de alimentos, un alimento o uno de sus constituyentes reduce significativamente un factor de riesgo de aparición de una enfermedad humana.

El Reglamento establece las bases para la autorización de declaraciones de salud; así se indica que para establecer una declaración de salud *será necesario demostrar, con fundamento científico, en qué medida el efecto declarado es beneficioso para la salud humana al haberse establecido una relación causa-efecto entre el consumo del alimento y el efecto declarado. Indicándose también, la cantidad de alimento y cuál es el patrón de consumo requerido para alcanzar el efecto saludable y que pueda alcanzarse razonablemente, como parte de una dieta equilibrada, haciéndose constar, por último, el grupo específico en el que se realizó el estudio.*

La lista con las declaraciones saludables ha sido publicada por lotes (Declaraciones de propiedades saludables distintas de las relativas a la reducción del riesgo de enfermedad y al desarrollo y la salud de los niños) fue publicado en Octubre del 2009 (Buttriss y Benelam, 2010).

Con respecto a los alimentos funcionales, en el Anexo I del Reglamento 1924/2006 se establecen las Declaraciones nutricionales y las condiciones que se deben cumplir para poder hacer alegaciones a algún tipo de alimentos. La más interesante para el presente trabajo se recoge a continuación.

FUENTE DE [NOMBRE DE LOS MINERALES]

Solamente podrá declararse que un alimento es una fuente de vitaminas o minerales, así como efectuarse cualquier otra declaración que pueda tener el mismo significado para el consumidor, si el producto final contiene una cantidad significativa que produzca un efecto nutricional o fisiológico declarado, establecido mediante pruebas científicas que lo avalen.

Posteriormente, en el 2007, la Food Quality and Standards Service (AGNS) y Food and Agriculture Organization of the United Nations (FAO); 2007) difundieron unas pautas para ayudar a la reglamentación de los alimentos funcionales. En este

Introducción

documento la FAO también recomienda la elaboración de una lista con todos los principios activos alimentarios que son reconocidos a nivel internacional que debería ser revisada de manera regular y constante, teniendo en cuenta los nuevos descubrimientos científicos y tecnológicos. Los principios con actividad biológica pueden ser de origen animal, vegetal o microbiológico y deben ser seguros para la salud pública. También indica que se debe recopilar un listado de todos los métodos analíticos estándar para el análisis de principios activos con actividad biológica y que los compuestos activos tendrán que estar en los alimentos en una concentración que no sea excesiva ni insuficiente para ejercer su efecto beneficioso. La adición de un compuesto activo no influirá negativamente en el metabolismo de cualquier otro nutriente presente en el mismo alimento y debe permanecer estable en las condiciones habituales de envasado, almacenamiento, venta, elaboración y consumo.

También se deben individualizar y desarrollar marcadores que puedan predecir los efectos beneficiosos o dañinos de los compuestos adicionados y no se debe fomentar el consumo excesivo de dichos productos, sino aconsejar una dieta sana y equilibrada, en la cual, la incorporación del producto funcional ayude a ampliar la gama de productos beneficiosos presentes en el mercado.

El Parlamento Europeo en la Directiva 2008/100/CE de la Comisión de 29 de octubre de 2008 por la que se modifica la Directiva 90/496/CEE del Consejo, relativa al etiquetado sobre propiedades nutritivas de los productos alimenticios, en lo que respecta a las cantidades diarias recomendadas, los factores de conversión de la energía y las definiciones.

Hoy en día, continúa el esfuerzo llevado a cabo por las administraciones y los científicos para llegar a un acuerdo y así, que los alimentos que aportan beneficios claros y demostrados puedan llegar a todos los consumidores.

El Parlamento Europeo en el 1924/2006 quedó modificado por el Reglamento (UE) n° 432/2012, en el que se establece una lista de declaraciones autorizadas de propiedades saludables de los alimentos, distintas de las relativas a la reducción del riesgo de enfermedad y al desarrollo y salud de los niños. Así pues, en el caso del calcio, *se puede declarar que contribuye a la coagulación sanguínea, al metabolismo energético normal, al funcionamiento normal de los músculos, de los neurotransmisores y de las enzimas digestivas, que contribuye al proceso de diferenciación y división celular y que es necesario para*

Introducción

el mantenimiento de los huesos y dientes, en condiciones normales. Cualquiera de estas declaraciones, puede utilizarse respecto a alimentos que son, como mínimo, fuente de calcio de acuerdo con la declaración FUENTE DE [NOMBRE DE LAS VITAMINAS] Y/O [NOMBRE DE LOS MINERALES] que figura en el anexo del Reglamento (CE) no 1924/2006.

En 2010, se puso en marcha el programa **Bioclaims**, financiado por la Comisión Europea, y orientado a la búsqueda de nuevos biomarcadores que puedan ser utilizados por el sector alimentario para acreditar de manera precisa los efectos saludables de los alimentos y por otra parte, para regular la publicidad engañosa de los productos con supuestas propiedades beneficiosas para la salud. De este modo, los anuncios de alimentos saludables sólo podrán aplicar o emplear si sus afirmaciones están sustentadas en una evidencia científica rigurosa, acreditada por el Panel de Nutrición de la Autoridad Europea en Seguridad Alimentaria.

1.4.3. ALIMENTOS ENRIQUECIDOS CON CALCIO

La incidencia en los últimos años de enfermedades derivadas por un déficit en calcio como las mencionadas en apartados anteriores, ha promovido el enriquecimiento de diversos productos con este mineral por parte de la industria alimentaria. Así, se comercializan productos elaborados con harinas como bizcochos o panes (Fik y col., 2012), cereales de desayuno e incluso en productos integrales (Fik y col. 2012) enriquecidos en calcio.

Sin embargo, la industria láctea ha sido uno de los sectores más competitivos y más innovadores al lanzar al mercado leche y derivados lácteos enriquecidos con Ca.

➤ Leche y productos lácteos

La leche es uno de los productos más utilizados por la industria para la elaboración de alimentos funcionales. Como describe Guo, (2009) las denominadas leches modificadas son aquellas enriquecidas con vitaminas, proteínas o probióticos o que en su proceso tecnológico se les ha eliminado la lactosa para evitar los casos de intolerancia a la misma. Al ser uno de los alimentos más consumidos, la leche se ha convertido en uno de los mejores vehículos de calcio.

La leche convencional presenta entre 250-300 mg Ca/300 ml (Moreiras y col., 2003), aunque su contenido puede ser incrementado a través de la adición de sales de calcio como el carbonato cálcico o de leche concentrada o en polvo como fuentes extras

Introducción

de calcio. De acuerdo la normativa comunitaria (Parlamento Europeo. Reglamento 1924/2006. Relativo a las declaraciones nutricionales y de las propiedades saludables de los alimentos), la leche comercializada como “enriquecida” con un nutriente debe contener en 100 ml al menos el 15% de la ingesta diaria recomendada (IDR) para la población general en dicho nutrientes.

A continuación se relacionan algunos de los trabajos publicados en los que se han ensayado diferentes tipos de sales cálcicas para su enriquecimiento; son el de Mekmene y col. (2009) que emplean CaCl_2 , fosfato y citrato cálcico, siendo de los primeros el publicado por Cowley y col. (1987); Philippe y col., (2003) enriquecieron con CaCl_2 en leches desnatadas de vaca. Posteriormente, Singh y col. (2007) lo hicieron con cloruro, lactato y gluconato cálcico en leche y López-Aliaga y col., (2009) en leche de cabra. También se han enriquecido helados con carbonato de calcio Van der Hee y col., (2009), cloruro de calcio (Costa y col., 2008) u otras sales cálcicas (Ferrar y col., 2010) o yogures a los que se han adicionado sales como lactato cálcico (Singh y Muthukumarappan (2008).

➤ Zumos y bebidas

Al ser altamente hidrosoluble, el calcio se perfila como un ingrediente adecuado para su incorporación en zumos y bebidas. Algunos autores que han estudiado el enriquecimiento en distintos zumos son Cerklewski, (2005) y Cilla y col., (2012); también están las denominadas “bonehealth drinks” descritas por (Keller, 2006) y las bebidas elaboradas a partir de soja enriquecidas con cloruro de calcio (Pathomrungsriyounggul y col., 2010).

Introducción

En la Tabla 1 se recogen algunos de los alimentos enriquecidos en calcio, presentes en los mercados, mencionados anteriormente.

Tabla 1: Alimentos enriquecidos en calcio.

<i>Alimento</i>	<i>Cantidad de calcio (Ca mg/100 g o 100 ml)</i>
<i>Leche</i>	160-200
<i>Mantequilla</i>	120
<i>Derivados lácteos</i>	150-360
<i>Queso</i>	170
<i>Productos elaborados con fruta</i>	70
<i>Cereales</i>	220-830
<i>Pan</i>	330
<i>Productos de panadería</i>	160-230
<i>Barritas de cereales</i>	540-870
<i>Salsa de manzana</i>	160
<i>Zumos de frutas</i>	80-130
<i>Zumo de naranja enriquecido en Ca</i>	150
<i>Chocolate</i>	323
<i>Agua enriquecida en Ca</i>	12,5
<i>Filete de pavo</i>	240
<i>Macedonia</i>	60-130

1.5. PRODUCTOS CÁRNICOS FUNCIONALES

La carne se caracteriza por ser uno de los alimentos con mayor valor nutritivo, siendo fuente importante de proteínas, vitaminas y minerales.

Las proteínas de la carne son de alto valor biológico y nutricional, ya que poseen los ocho aminoácidos esenciales (fenilalanina, isoleucina, leucina, lisina, metionina, treonina, triptófano y valina) y también posee histidina, aminoácido que resulta esencial en la infancia (Sánchez de Medina Contreras, 2010). Por esto se puede indicar que la carne y los productos cárnicos son una valiosa fuente de nutrientes esenciales (Carbajal, 2005; Sánchez de Medina Contreras, 2010).

Las vitaminas aportadas en mayor proporción por este tipo de productos son las del grupo B. Estos alimentos aportan aproximadamente el 21% de vitamina B₁, el 15% de riboflavina, el 22% de equivalentes de niacina, el 23% de vitamina B₆ y el 15% de vitamina B₁₂ del total de la dieta. La carne y los productos derivados son la principal fuente de vitamina B₆ y la segunda de niacina, además, junto con el pescado y otros productos de origen animal como los huevos y la leche, son la única fuente natural de vitamina B₁₂ (AESAN, 2012).

Dentro del grupo de minerales, este tipo de productos aportan en un 26% del total del zinc de la dieta, el hierro, en un 16%, magnesio en un 9%, sodio en un 21% y potasio en un 13% (Delgado, 2013). Sin embargo, aunque es un alimento ricos en numerosos nutrientes, se caracteriza por ser deficitario en calcio.

A pesar de ser una fuente rica de proteínas, vitaminas y minerales, a la carne y los productos cárnicos se les ha atribuido un efecto negativo sobre la salud relacionado con el contenido en grasa y colesterol (Biesalski, 2005; McAfee y col., 2010).

Por todo ello, la industria alimentaria en los últimos años ha trabajado para desterrar la mala imagen de estos productos y persiguiendo la idea de ofrecer al consumidor productos cárnicos más “saludables”.

1.5.1. ESTRATEGIAS PARA ELABORAR PRODUCTOS CÁRNICOS MÁS SALUDABLES

Para el desarrollo de productos cárnicos más saludables se lleva a cabo diferentes estrategias encaminadas a optimizar su composición y presentar las características beneficiosas que contribuyan a la mejora del estado de bienestar y la reducción del riesgo de enfermedad (Fernández-Ginés y col., 2005; Arhiara, 2010; Decker y Park, 2010; Zhang y col., 2010; Olmedilla-Alonso y Jimenez-Colmenero 2014):

- Relativas a la producción animal: relacionadas con la selección genética de los animales y aspectos nutricionales.
- Relativas a los sistemas de transformación de carne aplicando fundamentalmente procesos de reformulación: reducir, eliminar, incrementar y/o remeplazar ingredientes bioactivos con carácter exógeno o endógeno
- Relativas a las condiciones de procesado, almacenamiento y consumo que pueden suponer un aumento o pérdida de nutrientes o la formación de otros nuevos que puedan afectar a la calidad y valor sensorial de estos productos.

Sin duda la segunda estrategia es la que ha centrado más estudios científicos y un mayor desarrollo industrial. Se han desarrollado productos cárnicos en los que se ha reducido en contenido en grasa y en Na, los componentes de la carne que pueden afectar más negativamente a la salud del consumidor. Igualmente, en esta estrategia se incluye la incorporación de compuestos bioactivos, donde se encuadra el presente trabajo.

La grasa, contribuye tanto en el sabor, como en la textura y en la apariencia de los productos cárnicos, incrementando su palatabilidad y saciedad durante las comidas. Sin embargo, las desventajas de la grasa pesan más al favorecer la obesidad, algunos tipos de tumores, la presión arterial alta y aumentar el riesgo de enfermedades cardiovasculares (Oba y col., 2006; Ozvural y Vural, 2008; McAfee y col., 2010).

La incidencia de este tipo de enfermedades ha promovido la aparición de diversas campañas por parte de las instituciones sanitarias como la American Heart Association, American Cancer Society y la OMS que han propuesto un límite de ingesta de grasa total de no más del 30% del total de las calorías estipuladas para cada individuo según género y rango de edad (OMS, 2009). Los productos elaborados que presenten una reducción de al menos el 30%, podrán ser considerados de acuerdo con

el Parlamento Europeo en el Real Decreto 1047/2012 de la Unión Europea, como productos reducidos en grasa.

La reducción de grasa puede ser manual en las piezas cárnicas, reformulando los productos cárnicos y sustituyendo la grasa por otros ingredientes que simulen las características sensoriales de la grasa o una tercera opción que es modificar el perfil lipídico sustituyendo parte de la grasa saturada por otros lípidos más saludables (Fernández-Ginés y col, 2005; Toldrá y Reig, 2011).

Los altos niveles de Na se han relacionado con la hipertensión arterial (Costa-Corredor y col., 2009) que es el factor de riesgo más importante para el desarrollo de enfermedades cardiovascular (OMS, 2009). Por ello, en los últimos años, se ha recomendado reducir la ingesta de sal. En la elaboración de productos hiposódicos se deben tener en cuenta la percepción de sapidez que aporta dicho compuesto, la intensidad del sabor y los cambios en la textura como el aumento de la cohesión en el producto (Ruusunen y Puolanne, 2005; Costa-Corredor y col., 2009; Poulanne y Halonen, 2010.) En el caso de los productos cárnicos fermentados, la reducción de sal es comprometida, ya que promueve una mayor actividad de agua, que favorece el incremento de una microbiota desaconsejable. (Ruusunen y Puolanne, 2005; Costa-Corredor y col., 2009; AESAN, 2009).

Hay tres estrategias para reducir el contenido en sodio en productos cárnicos Desmond (2006) y Doyle y Glass (2010): Disminuir el contenido en sal, sustituir todo o parte del NaCl por otras sales cloradas (KCl, CaCl₂ y MgCl₂) o no cloradas como son las sales fosfatadas. Una tercera estrategia es la adaptación de los procesos tecnológicos habituales incluyendo la combinación de cualquiera de las estrategias comentadas anteriormente (Kloss y col., 2015).

En la presente tesis, se han elaborado productos cárnicos frescos (hamburguesas) sin sal y otros reducidos, a los que se les adicionó la mitad del contenido en NaCl utilizado habitualmente por las industrias cárnicas.

1.5.2. PRODUCTOS CÁRNICOS ENRIQUECIDOS CON CALCIO

En capítulos anteriores se ha descrito la importancia del calcio en la dieta y las repercusiones negativas que el déficit de calcio puede tener en la salud. Por ello, se han realizado muchas investigaciones y esfuerzos a nivel industrial encaminados al desarrollo de alimentos enriquecidos en este mineral esencial. Se pueden destacar los productos elaborados con cereales (Brandt, 2002; Berasategi y col., 2011), panes (Fik y col., 2012), leche y derivados lácteos, etc. (Guo, 2009; López-Aliaga y col., 2009; Van der Hee y col., 2009).

La carne y derivados cárnicos tienen una importancia relevante en la alimentación humana. Los productos cárnicos forman parte de la dieta habitual en los países occidentales y sobre todo en la zona del Mediterráneo donde la variedad de productos los hace ser un alimento atractivo para el consumidor. Esto hace que estos productos sean adecuados para su transformación en alimentos funcionales. La reducción de grasa y de Na son estrategias plenamente desarrolladas e implantadas en la industria alimentaria, pero su enriquecimiento con ingredientes funcionales es una estrategia dinámica que permite ensayar nuevos productos que vehiculen compuestos bioactivos. En este sentido, se puede decir que se han enriquecido con fibra, PUFA, selenio, soja, entre otros muchos compuestos (García-Iníquez y col., 2010; Berasategi y col., 2011; García y col., 2012). Ya en 2006, Arihara realizó una revisión sobre las nuevas estrategias para obtener productos funcionales innovadores, en el que, las nuevas tendencias en el desarrollo de productos cárnicos son la incorporación de calcio, siendo la misma, uno de los objetivos del FOSHU en Japón. Este trabajo se ha encaminado a estudiar la viabilidad tecnológica del calcio como ingrediente funcional.

El enriquecimiento en calcio ha sido enlazado por algunos autores con la elaboración de productos cárnicos hiposódicos. Gimeno y col., (1998, 1999) estudiaron el efecto de una mezcla de cloruro sódico, potásico, cálcico y de magnesio como un sustituto parcial de NaCl en diferentes productos madurados. La incorporación de CaCl_2 produjo un descenso del pH y un ligero aumento del pigmento nitroso hemo con el consiguiente aumento de la intensidad del color. No percibieron sabores anómalos pero sí una disminución del sabor salado que comprometía la aceptación general del producto. En estos productos la cantidad de calcio incorporado fue inferior al 0,5%, cantidad insuficiente para que se puedan considerar como una fuente de calcio.

Introducción

Similares resultados fueron encontrados por Flores y col. (2005), quienes observaron que en embutidos madurados, el cloruro cálcico incorporado en concentraciones de 0,05% producía unos matices sápidos extraños debido, según sus estudios a la formación de numerosos esteres etílicos. A concentraciones del 0,5% el sabor fue menos aceptable y los productos se oxidaron con mayor facilidad lo que provocaba el descenso de la calidad sensorial.

Otros autores han estudiado la posibilidad de usar la cáscara de huevo como una fuente dietética de calcio. Daengprok y col (2002) estudiaron el efecto de la adición de lactato cálcico comercial o procedente de cáscara de huevo a un embutido fermentado tailandés (Nhams) y observaron que la única diferencia fue en la textura de los productos elaborados con el lactato cálcico procedente de la cáscara de huevo. Estos autores sugieren que la incorporación de 150 mg/100 g sería la cantidad límite a incorporar y se correspondería con un 18,7% de la IDR del calcio. Devatkal y Mendiratta (2001) estudiaron la adición de lactato cálcico en productos reestructurados de cerdo con fosfato o con alginato cálcico. Observaron que la presencia de lactato cálcico mejora las características sensoriales de estos productos.

Cuando se plantea el enriquecimiento de un producto cárnico mediante la incorporación directa de sales cálcicas es imprescindible conocer cuál sería la más adecuada. Teniendo en cuenta que el fundamento del enriquecimiento es conseguir o potenciar el valor nutritivo de un alimento, la sal cálcica más adecuada sería aquella que presente una buena biodisponibilidad, para lo cual debería tener una buena solubilidad. Además, la adecuación de la sal cálcica pasaría por no producir cambios tecnológicos y sensoriales en el producto enriquecido, por tener una baja higroscopicidad para favorecer su manejo y almacenamiento y, finalmente, que sea económico (Selgas y García, 2008). En definitiva, se busca siempre un equilibrio entre los resultados tecnológicos y la calidad sensorial del producto final.

En la revisión realizada por Korstanje y Hoek, (2001) se hace una comparativa de diferentes estudios de investigación realizados sobre la biodisponibilidad del calcio, y concluyen en la dificultad que existe en buscar una similitud debido a los múltiples factores que influyen en su absorción y que han sido descritos previamente. Sin embargo, extrajeron una serie de conclusiones que permiten establecer diferencias significativas entre la biodisponibilidad de unas sales y otras. Así, la mayor biodisponibilidad (en torno al 30%) se corresponde al citrato-malato cálcico (CMC),

Introducción

seguido del calcio procedente de la leche, el gluconato cálcico (GC) y lactato cálcico (LC) (Figura 10 y 11). Le siguen, ya con diferencia, el carbonato, el fosfato y, finalmente, el citrato cálcico.

Figura 10: Promedio de la absorción de distintas fuentes de calcio en prueba *in vivo* (%). Fuente: Korstanje y Hoek (2001)

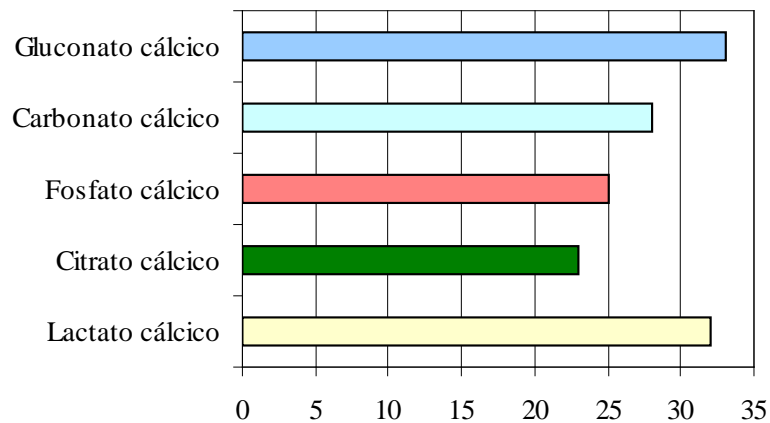
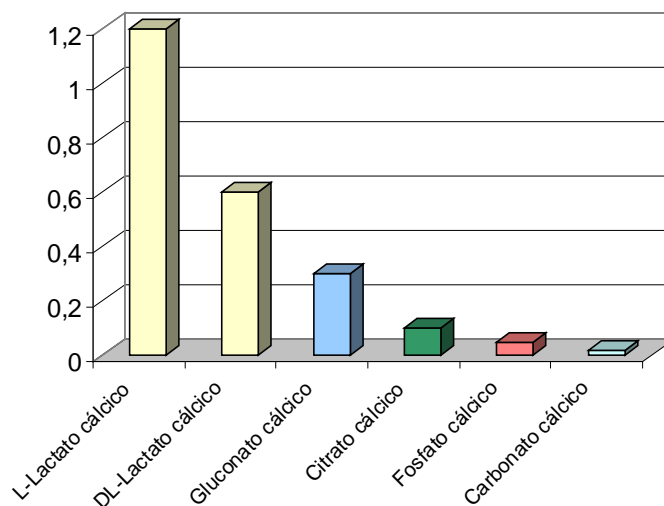


Figura 11.: Promedio de la solubilidad de distintas fuentes de calcio (%). Fuente: Korstanje y Hoek (2001)



De todo lo anteriormente expuesto, se deduce que el interés de este trabajo ha sido el desarrollo de productos cárnicos enriquecidos en calcio, el estudio de sus propiedades tecnológicas y sensoriales. Además se ha estudiado la biodisponibilidad

Introducción

del calcio con el fin de hacer una aproximación al conocimiento de la efectividad y el aprovechamiento real del ingrediente incorporado.

El fin último es contribuir al abanico de posibilidades de nuevos productos cárnicos que aporten un valor añadido a los ya existentes y que mejoren la imagen que el consumo de carne y productos cárnicos tienen en la sociedad actual. No hay que olvidar que las fuentes de información en las que más confía el consumidor son los profesionales de la salud, los científicos universitarios y las organizaciones de consumidores, seguidos de los científicos que trabajan en la Industria alimentaria (Rollin y col., 2011). Nuestra responsabilidad y en consecuencia la finalidad última de trabajos como el que aquí se desarrollan es abundar en esta línea y contribuir a la desaparición de los tópicos que limitan el consumo de carne y productos cárnicos.

Capítulo 2: JUSTIFICACIÓN Y OBJETIVOS

Capítulo 2: Justificación y Objetivos

La carne y los productos cárnicos son componentes esenciales de la dieta en los países desarrollados, siendo aceptados ampliamente por los consumidores. Sus numerosas y variadas formas de presentación y su relevante contribución a la ingesta de nutrientes, sobre todo proteínas, hace que la carne y productos cárnicos se perfilen como uno de los alimentos más importantes de la dieta. Sin embargo, a pesar de sus características nutricionales y sensoriales, su consumo se ha visto afectado por varios factores entre los que destacan la educación nutricional y la situación económica. En la actualidad, el factor más limitante en los países desarrollados es el efecto sobre la salud del consumidor.

Por ello, se hace imprescindible la innovación del sector cárnico y el desarrollo de nuevos productos cuya composición se haya modificado con el fin de ceñirse cada vez más a las nuevas orientaciones nutricionales. Así se lanzarían al mercado productos cada vez más atractivos para el consumidor. Dentro de esta línea, se encuentra la utilización de los productos cárnicos como vehículo de ingredientes funcionales que pueden ayudar a mejorar el estado de salud y bienestar de la población sin modificar los hábitos de consumo, que tan difíciles son de cambiar.

Son muchos los compuestos bioactivos que se han incorporado con éxito a los productos cárnicos, pero hay otros muy interesantes que no han sido objeto de estudios de esta naturaleza a pesar de que su relevancia en la salud sugiere una mayor ingesta, al menos, en una parte de la población. Es el caso del calcio, cuya importancia en el organismo aconseja aumentar las fuentes de calcio para asegurar una ingesta adecuada. Por todo ello resulta muy atractivo e interesante el desarrollo de productos cárnicos enriquecidos en calcio con características tecnológicas y sensoriales lo más próximas posible al homólogo convencional, al cual enriquecen.

En la actualidad está bien establecido que estudios de esta naturaleza deben ir acompañados de la determinación de la bioaccesibilidad del compuesto incorporado. En este trabajo se ha contemplado establecer mediante pruebas *in vitro* qué cantidad del calcio adicionado estaría disponible para realizar su función en el organismo. Hay que tener en cuenta además, que en el presente estudio el calcio se incorpora a productos cárnicos que son matrices complejas en las que coexisten diferentes

Justificación y Objetivos

nutrientes, entre los que se establecen múltiples interacciones que influyen de forma definitiva en las características del producto final. Estas interacciones pueden hacer que el ingrediente funcional, el calcio, no esté disponible para su absorción en cantidad suficiente para tener el efecto beneficioso por el que ha sido añadido. Por ello resulta imprescindible estudiar si la matriz cárnica interfiere con el calcio y, en consecuencia, con su bioaccesibilidad.

Por esta razón, el **objetivo** de este trabajo ha sido el enriquecimiento de productos cárnicos con diferentes sales cálcicas y el estudio de sus propiedades tecnológicas y sensoriales, así como el conocimiento de la bioaccesibilidad del calcio incorporado.

Se han planteado los siguientes **objetivos parciales**:

- Diseñar productos cárnicos frescos, cocidos y madurados enriquecidos en calcio utilizando para ello diferentes concentraciones de distintas sales cálcicas seleccionadas por su solubilidad/bioaccesibilidad.
- Conocer la viabilidad tecnológica y sensorial de cada una de las sales estudiando los posibles cambios que puedan producir en las características propias de los distintos tipos de productos cárnicos.
- Estudiar la bioaccesibilidad del calcio a partir de los productos diseñados utilizando para ello dos métodos *in vitro* que simulen el proceso gastrointestinal: dializabilidad y la utilización de la línea celular Caco-2.

Capítulo 3: MATERIAL Y MÉTODOS

Capítulo 3: MATERIAL Y MÉTODOS

3.1. MATERIAL

3.1.1. MATERIAL GENERAL

El agua destilada se obtuvo con el equipo Millipore Elix 3, que proporciona una calidad de agua con una resistividad del orden de 15 M Ω .

Las pesadas ordinarias se realizaron en balanzas monoplano And modelo EK-1200^a, mod. FX-320 y mod. GF-2000; las pesadas de precisión se realizaron en la balanza analítica Sartorius mod. 2443.

La conservación de las muestras y sus extractos de congelación (-32°C) se realizaron en arcones Liebherr y se mantuvieron en refrigeración en frigoríficos Philco, Fagor, Electrolux o Kelvinator.

El homogeneizado de las muestras se realizó en un homogeneizador Polytron mod. PT 10-35.

Las centrifugas fueron Sorvall mod. RC-5B equipada con motores mod. GSA, GS3 y S600, Alresa mod. Digitor y una minífuga Heraeus mod. PicoBiofuge.

Las pipetas automáticas fueron de la marca Pipetman® P (Gilson, S.A.S.)

Las desecaciones se realizaron en una estufa Heraeus mod. KFTU-K

El pH se midió con pH-metro Crison mod. 2001

La determinación de la actividad de agua (a_w) se realizó en un higrómetro de punto de rocío Decagon CX-1.

Las incubaciones en agitación se realizaron en un agitador termostático Thermo Scientific MaxQ4000, SHKE4000-6CE, Marietta, Iowa (U.S.A.)

Los cultivos celulares se incubaron en un incubador Thermo Scientific Heraeus® BB15 (Loughborough, Reino Unido) a 37°C, 95% de humedad y 5% de CO₂.

Los cultivos celulares se manejaron en esterilidad en una cabina Telstar mod. Bio-II-A

Material y Métodos

Las placas basales de 24 pocillos y las placas reservorio fueron COSTAR #3526 y COSTAR #3395 respectivamente.

Las diluciones se realizaron con una pipeta multicanal automática Eppendorf Research® Plus de 8 canales (rango de volumen: 10-100 µl)

La permeabilidad celular se determinó con un polarímetro Millicell® ERS-2 con los electrodos MERSSTX01

La determinación del calcio se llevó a cabo con un espectrómetro de absorción atómica Perkin Elmer Mod. 5100 PC y un espectrómetro de emisión atómica con plasma acoplado inductivamente Perkin-Elmer Mod. DV 3300 (Perkin-Elmer, Norwalk, CT).

Las muestras se homogeneizaron en un homogeneizador Stomacher mod. S10455 utilizando bolsas estériles con filtro (Stomacher 400. Fisher Scientific).

Los medios de cultivo empleados para los recuentos microbiológicos fueron de Oxoid.

Los autoclaves utilizados fueron Selecta mod. Autotester G y 43-G.

La membrana de celulosa de diálisis (25 mm de diámetro) presentaba un rango de 12000-14000 Da (D977, Sigma-Aldrich).

3.1.2. MATERIAL DE PLANTA PILOTO

Picadora 10 Grinder, Falsf Co. empleando una placa de 3 mm de diámetro.

Amasadora-Mezcladora Mainca Mod. RM-20.

Plancha de cocina marca Princess mod. Table Chef Pro.

Termómetro digital Testo modelo 735.

Cuchillos de carnicería Manager mod. Solingen.

Embutidora neumática Cato mod. ESG20.

Tripas artificiales suministradas por Betex Pack.

Material y Métodos

Grapadora manual Hemgrap mod. H-2700.

Loncheadora de sobremesa Sola mod. 859.

Cámara de maduración Binder Mod. KBF 115.

Cutter vertical Robot-Coupé mod. 20v.

Horno de convención Coven mod. Tec 6MX.

Termómetro Interface EBI-AE 2000

3.1.3. REACTIVOS Y DISOLVENTES

Todos los reactivos y disolventes utilizados fueron suministrados por las firmas Merck, Panreac Química, Fluka y Sigma-Aldrich.

Tampón Hank's Balanced Salt Solution (HBSS) con Ca^{2+} y Mg^{2+} (Invitrogen. Life technologies S.A.

3.1.4. MATERIAL BIOLÓGICO

- Medio de cultivo estándar para las células Caco-2:
 - Dulbecco's Minimum Essential Medium (DMEM) 1g/L glucosa.
 - 10% Suero Fetal Bonito (SFB).
 - 1% Glutamina 200 mM.
 - 1% Penicilina (10.000 U/ml) y Estreptomicina (10 mM/ml) (Laboratorio Gibco®. Life Technologies, Inc., Gaithersburg).
- Todas las enzimas empleadas en el estudio de biodisponibilidad fueron abastecidas por Sigma-Aldrich: pepsina (EC 232-629-3), conjugado de pancreatina-bilis de origen porcino (extracto pancreático EC 232-468-9 y extracto biliar EC 232-369-0) para la digestión intestinal.
- Placa de células Cacos-2 (CacoReady™, 2010) (Advancell®).

3.1.5. SALES

Las sales cálcicas, calidad *additio*, fueron de Panreac Química: Lactato cálcico 5-hidrato (LC) (E-327, F.C.C.) y D-Gluconato cálcico 1-hidrato (GC) (E-578, F.C.C.). Citrato malato cálcico (CM) (E-333 y E-352, F.C.C.) Jost Chemical Co. Europe

El cloruro sódico (NaCl) procedía de Panreac Química.

3.2. MÉTODOS

3.2.1. ELABORACIÓN DE PRODUCTOS CÁRNICOS

La fabricación de los productos cárnicos se realizó en la Planta Piloto perteneciente al Departamento de Nutrición, Bromatología y Tecnología de los Alimentos de la Facultad de Veterinaria (Universidad Complutense, Madrid).

3.2.1.1. SELECCIÓN Y PREPARACIÓN DE LAS SALES CÁLCICAS ENSAYADAS

Para la elección de las sales de calcio a estudiar se tuvieron en cuenta dos la solubilidad y la bioaccesibilidad. De acuerdo con los trabajos realizados por Korstanje y Hoek (2001) y Aguilar y col. (2007) entre las sales cálcicas más biodisponibles se encuentran el gluconato y el lactato cálcico y en cuanto a su solubilidad el lactato, el gluconato y el citrato malato cálcico. Por ello, se consideró que estas tres sales eran las más adecuadas para su incorporación en los productos cárnicos.

Las sales se incorporaron en cantidades diferentes y crecientes, buscando siempre alcanzar un equilibrio entre la máxima cantidad de calcio aportada y la mejor calidad tecnológica y sensorial del producto obtenido. En cualquier caso, las sales cálcicas se incorporaron a la masa de los productos cárnicos en cantidad suficiente para que el producto final tuviese una concentración entre el 20-40% de la IDR Ca/ 100 g de producto. El valor de referencia utilizado en nuestro trabajo fue la ingesta diaria de calcio recomendada por el Institute of Medicine de EEUU (IOM, 2010) que es de 1000 mg/día para individuos sanos y adultos, ya que especifica dicha IDR en base a grupos poblacionales. En la legislación europea (Parlamento Europeo, Directiva Europea 2008/100/EC), se recomienda una ingesta diaria de 800 mg/100 g de producto, en base a la cantidad diaria recomendada (CDR), si bien no se hacen por grupos de población, sino en general.

Para alcanzar estas concentraciones, se tuvo en cuenta el contenido en calcio de cada una de las sales; así, el D-gluconato y el lactato cálcico aportan un átomo de calcio por cada molécula, mientras que una molécula de citrato-malato cálcico aporta seis. Las cantidades que se incorporaron de cada una de las sales fueron las que figuran en la Tabla 2.

Tabla 2: Cantidades de cada una de las sales cálcicas adicionadas en los productos cárnicos frescos experimentales (g/100 g producto)

Concentración final calcio	Gluconato Cálcico	Lactato Cálcico	Citrato-Malato Cálcico
20%	2,24	1,54	0,47
30%	3,36	2,31	0,71
40%	4,47	3,08	0,95

Excepto en los productos cárnicos frescos, a los que se adicionaron directamente a la carne picada, las sales cálcicas se incorporaron a las masas cárnicas mezcladas con las especias.

3.2.1.2. ELABORACIÓN DE PRODUCTOS CÁRNICOS FRESCOS: HAMBURGUESAS

La carne utilizada como materia prima fue aguja de ternera (*Quadriceps femoris*) adquirida en un comercio local. El traslado hasta la Planta Piloto del Departamento se hizo en refrigeración. En primer lugar se procedió al corte de la pieza en forma de tiras con un cuchillo de carnicería y posteriormente se procedió a su picado utilizando una picadora provista de una placa con orificios de 3 mm.

La carne picada se separó en dos mitades destinadas, cada una de ellas, a un experimento. En el Experimento 1 se utilizó carne picada y en el Experimento 2, a la carne picada se añadió un 1,5% de NaCl

En cada uno de los experimentos se elaboraron 7 lotes:

- Lote 1: control sin calcio.
- Lote 2: GC al 20% IDR.
- Lote 3: GC al 30% IDR.
- Lote 4: LC al 20% IDR.
- Lote 5: LC al 30% IDR.
- Lote 6: CMC al 20% IDR.

Material y Métodos

- Lote 7: CMC al 30% IDR.

Para las pruebas de bioaccesibilidad se elaboró un lote adicional con CMC 40%

Las sales se adicionaron a la carne picada y para favorecer una distribución homogénea en la masa se utilizó una amasadora.

Los dos experimentos se realizaron por triplicado.

Una vez preparadas las mezclas, se separaron porciones de 50 g y se conformaron como hamburguesas utilizando como molde placas de Petri de 10 cm de diámetro. La altura de las hamburguesas resultantes fue de 1 cm, la adecuada para la realización de los análisis de textura que se harían posteriormente.

Las placas se cubrieron con una película de Parafilm y se mantuvieron en refrigeración a 2°C hasta su utilización. Durante la elaboración, la temperatura ambiente no superó los 18°C.

El cocinado de las hamburguesas se realizó en una plancha eléctrica precalentada a 180°C. Las hamburguesas se dejaron sobre la plancha durante 2 min por cada cara, para asegurar que la temperatura alcanzada en el interior de la muestra fuese de aproximadamente 60°C; este tratamiento fue suficiente para alcanzar el grado de “hecho” (Thornberg, 2005; Galán y col., 2010). El empleo de un termómetro digital portátil, ayudó a verificar dicha temperatura.

3.2.1.3. ELABORACIÓN DE PRODUCTOS CÁRNICOS COCIDOS: MORTADELAS

Como ejemplo de producto cárnico cocido se escogió la mortadela. Su fabricación se llevó a cabo de acuerdo a una fórmula tradicional como se muestra en el siguiente cuadro.

Tabla 3: Composición de los embutidos elaborados.

Magro de cerdo	Tocino de cerdo	Agua (hielo)	Especias
55%	30%	10%	5%

Material y Métodos

La carne magra y la grasa (tocino dorsal de cerdo) fueron adquiridas en un establecimiento local y transportadas en refrigeración hasta la Planta Piloto del Departamento. Las especias empleadas fueron una mezcla comercial de especias y aditivos (Procavi® “C-50” Ref.: 527) cedida por Anvisa (Arganda del Rey, Madrid) y especialmente preparadas para este tipo de productos. La mezcla contiene sal común, dextrosa, gelificante (carragenano E-407), proteína aislada de soja, especias y aceite esencial de pimienta negra, azúcar, emulgentes (trifosfato pentasódico E-451i, disfosfato tetrasódico E-450ii, polifosfato sódico E-452i), potenciador del sabor (glutamato monosódico E-621), corrector de la acidez (citrato trisódico E-331ii), antioxidante (ascorbato sódico E-301), conservadores (nitrato potásico E-252, nitrito sódico E-250), colorante (cochinilla E-120). La dosis máxima recomendada es de 50g/kg de masa.

a) Preparación de los ingredientes.

Se limpió el magro de cerdo y se eliminaron los restos de tejido conjuntivo con ayuda de un cuchillo de carnicería. Posteriormente se troceó en forma de cubos de unos 6 cm de grosor para favorecer una rápida congelación a -18°C. El tocino de cerdo se descortezó, se congeló y se cortó igualmente en trozos.

Las sales cálcicas y las especias se pesaron y prepararon como se ha descrito previamente.

b) Picado y formación de la pasta fina.

Previamente a su picado, para evitar romper la cadena de frío, tanto la carne como el tocino se mantuvieron en refrigeración (4°C) durante toda la noche. Así, en estado de semicongelación, se introdujeron en una cutter vertical que trabajaba a máxima velocidad (1500 rpm). Primero se procedió al picado de las carnes durante dos minutos tras el cual, se incorporó la mitad del hielo picado y la mitad de las especias en las que previamente se había mezclado la sal cálcica a estudiar. Se continuó con el trabajo mecánico durante dos minutos más, controlando la temperatura con una sonda termostática y finalmente, se añadieron el resto del hielo y de las especias con la sal cálcica, siguiendo con el trabajo mecánico el tiempo necesario para la formación de la emulsión. En ningún momento, la temperatura superó los 2°C.

Material y Métodos

Se realizó una fabricación por cada una de las sales cálcicas a estudiar y a cada una de las concentraciones (20, 30 y 40% IDR). Cada uno de los lotes se hizo por duplicado y tenía un peso aproximado de 2,5 Kg. Se elaboró un lote control sin ninguna sal cálcica.

c) Embutido

La pasta fina así obtenida se embutió en tripas artificiales Fibran-Pack con un diámetro de 80 mm, previamente rehidratadas.

Las tripas se cortaron en piezas de unos 40 cm de longitud y se sumergieron durante 30 min en agua tibia con el fin de humedecerlas y facilitar el llenado. Posteriormente, fueron grapadas y se sometieron a un tratamiento térmico.

De cada lote se obtuvieron 5 piezas con un peso aproximado de 500 g cada una. La identificación de los lotes se hizo mediante cintas de diferentes colores.

d) Tratamiento térmico

La gelificación de la pasta fina se realizó mediante cocción en un horno de vapor. Para ello se mantuvo la temperatura a 78 °C durante 30 min., suficiente para alcanzar una temperatura de 72 °C en el interior del producto. El control de este parámetro se llevó a cabo mediante un registrador de temperatura tomando datos cada dos minutos.

Tras la cocción, los lotes se enfriaron por inmersión en baños de agua fría y se mantuvieron en refrigeración a 4°C hasta su análisis.

Figura 12: Algunas fases del proceso de elaboración de las mortadelas.

Picado de la carne y mezcla con hielo, sales cálcicas y especias



Embutido y grapado de los lotes elaborados



Horneado de los lotes a 78°C



3.2.1.3. ELABORACIÓN DE PRODUCTOS CÁRNICOS MADURADOS: SALCHICHONES

a) Preparación de los ingredientes, picado y mezcla.

La elaboración de este tipo de productos se realizó de acuerdo a una fórmula tradicional de salchichón. La carne magra y grasa (tocino dorsal de cerdo) fueron obtenidas de un establecimiento local y el traslado se hizo en frío hasta la Planta Piloto del Departamento donde se realizó la fabricación.

La mezcla de especias y aditivos especiales para este tipo de embutidos (Salavi®) fue proporcionada por la empresa Anvisa (Arganda del Rey, Madrid). Los componentes de la misma son los siguientes: Sal común, Leche en polvo, Dextrina, Dextrosa, Especies, Proteína aislada de soja, Proteína de leche, Emulgentes (Difosfato sódico E-450i Polifosfato sódico E-452i Trifosfato pentasódico E-451i), Corrector de la acidez (Citrato trisódico E-331iii), Potenciador del sabor (Glutamato monosódico E-621), Conservadores (Nitrato potásico E-252 Nitrito sódico E-250) y Colorante (Cochinilla E-120). La dosis máxima autorizada es de 50g/kg.

Para la normalización del producto se utilizó el cultivo iniciador Bactoferm® T-SC-150 compuesto por dos cepas, *Staphylococcus carnosus* y *Lactobacillus sakei*. Este cultivo mixto se caracteriza por aportar un buen y típico aroma al producto elaborado y por producir una acidificación intermedia. Esta normalización sirvió para evitar en lo posible, que los cambios en la acidificación se manifestasen en cambios de textura, color o sabor que enmascarasen los que las sales de calcio pudieran aportar y que eran, precisamente, los que se querían valorar. El cultivo se mantuvo a -20°C hasta su utilización.

La fórmula empleada fue la que se muestra en la Tabla 4.

Tabla 4: Composición de los embutidos elaborados.

Magro de cerdo	Tocino de cerdo	Especias	Cultivo iniciador
70%	25%	5%	25g / 100Kg de masa

Se elaboraron 10 lotes de 2Kg aproximadamente, tres por cada uno de los tres tipos de sales, en los que se adicionó en cantidades que oscilaron entre 20-40% de la IDR y el lote control al que no se le adicionó ninguna sal cálcica.

La nomenclatura empleada para cada uno de los lotes indicaba la sal adicionada, el porcentaje de la IDR que aporta. Por ejemplo: Lactato cálcico al 20% de la IDR (LC20%).

Teniendo en cuenta que en los embutidos madurados se producen pérdidas de agua en torno al 50% a lo largo de la maduración, la cantidad de cada una de las sales cálcicas fue la mitad de la que correspondería a la especificada en la Tabla 2.

Según las especificaciones del fabricante, el cultivo iniciador se mantuvo a -20°C hasta el momento de su adición a la masa, lo que se hizo directamente, sin necesidad de ningún diluyente. La cantidad adicionada se calculó en base al total de masa preparada, teniendo en cuenta que cada sobre contenía la cantidad de starter necesaria para 25 kg de masa fresca.

Las sales cálcicas se incorporaron a la carne picada junto con las especias y se procedió a su amasado hasta conseguir una distribución homogénea.

Cada lote se realizó por duplicado.

b) Embutido.

Los lotes se embutieron en tripas previamente sumergidas en agua tibia durante al menos 30 min con el fin de ablandarlas y facilitar su llenado, tal y como se describió en los embutidos cocidos; los extremos se cerraron con grapas. Una vez cerrados, los salchichones se pincharon con una aguja estéril para sacar el aire almacenado en su interior.

Material y Métodos

De cada lote se obtuvo un número de 5-6 piezas con un peso de 200 a 250 g cada una. Para poder diferenciar los lotes, se emplearon cordones de diferentes colores.

c) Maduración.

Los salchichones se introdujeron en una cámara de maduración programada con las condiciones que habitualmente se utilizan en la industria para este tipo de productos cárnicos:

- 22°C y 90% Humedad durante 48 h.
- Rampa de descenso de humedad y temperatura (48h):
 - Humedad: descenso del 90% al 88% en 24 h y en las 24 h siguientes, de 88% al 85%.
 - Temperatura: descenso de 22°C a 16°C en las primeras 24 h, para en las 24 h posteriores estabilizarse en 13°C.
- 13°C y 85% Humedad hasta el final del período de maduración (día 21).

En la siguiente tabla quedan reflejadas las condiciones indicadas.

Tabla 5: Programa de maduración.

Humedad (%)	Temperatura (°C)	Tiempo (horas)
90	22	48
90	22	24
88	16	24
85	13	99*

* El tiempo reflejado en esta casilla significa al que deben estar los embutidos a esas condiciones de humedad y temperatura hasta que transcurran los 21 días desde el momento en el que se introdujeron los embutidos en la cámara.

Durante el período de maduración, los lotes se pulverizaron con sorbato potásico ($C_6H_7O_2K$) al 20%, para evitar el crecimiento de mohos en la superficie.

Una vez madurados, se mantuvieron en refrigeración a 4°C hasta su análisis.

Figura 13: Proceso de elaboración de los salchichones.

Picado de carne y adición de la sales cálcicas y especias



Embutido y grapado de los lotes elaborados



Maduración de los salchichones elaborados en la cámara de maduración

(En la imagen: salchichones enriquecidos con LC20%)



3.3. TÉCNICAS ANALÍTICAS

3.3.1. DETERMINACIÓN DEL pH Y LA ACTIVIDAD DE AGUA (a_w)

El pH de las muestras se midió a temperatura ambiente en un pH-metro previamente calibrado a pH 7 y 4. Para ello, se homogeneizó 1 g de las muestras con 9 ml de suero fisiológico (ClNa 0,85%) y se introdujo el electrodo de vidrio procediéndose a la lectura.

La determinación de la actividad de agua (a_w) se realizó a temperatura ambiente (22°-25° C). Las muestras a analizar se picaron en trozos pequeños y se depositaron en unas cápsulas de plástico, las cuales previamente estabilizadas durante dos horas, se introdujeron en la cubeta del higrómetro. La lectura se obtuvo tras un período aproximado de 1 -2 min.

En ambos análisis, cada muestra se analizó por quintuplicado.

3.3.2. DETERMINACIÓN DEL EXTRACTO SECO

El extracto seco se estimó de acuerdo con el método 950.46 B de la AOAC (2011). Para ello, las muestras (5 gr aprox.) pesadas en una báscula de precisión, se depositaron en cápsulas de porcelana de peso conocido y se procedió a su secado en una estufa a 110°C. Tras 48 h, se fueron realizando pesadas hasta que las muestras alcanzaron un peso constante. El peso de la muestra desecada (gramos) se determinó según la siguiente fórmula:

$$\text{Muestra desecada} = (\text{muestra desecada} + \text{cápsula vacía}) - \text{cápsula vacía}$$

El extracto seco (%) se determinó según la siguiente fórmula:

$$\% \text{ Extracto seco} = (\text{g muestra desecada}) / \text{g muestra fresca} * 100$$

Y el de humedad (H):

$$\% \text{ Humedad} = 100 - \% \text{ extracto seco}$$

Las determinaciones también se realizaron por quintuplicado.

3.3.3. DETERMINACIÓN DE LA CAPACIDAD DE RETENCIÓN DE AGUA (CRA)

La capacidad de retención de agua se determinó por el método descrito por Zamorano y Gambaruto (1997). Para ello se pesaron muestras de 0,1 g, se dispusieron sobre un cuadrado de papel de filtro y se comprimieron entre dos placas de metacrilato translúcidas durante 1 minuto. Se midió con un planímetro el área descrita por la carne comprimida y el del agua que había absorbido el papel de filtro. Se aplicó la siguiente fórmula:

$$\text{CRA} = [\text{área del líquido (cm}^2\text{)} - \text{área de la carne (cm}^2\text{)}] \times [9,47/\text{humedad de la muestra (mg)}] \times 100$$

Las medidas se hicieron por quintuplicado.

3.3.4. ANÁLISIS MICROBIOLÓGICO

Durante el proceso de maduración en los salchichones se hizo un seguimiento de la microbiota desde la masa inicial hasta el final del periodo de maduración (21 días), tomando muestras cada 48 h durante la primera semana y cada cinco días hasta el final del proceso.

Las muestras fueron tomadas al azar de cada uno de los lotes elaborados. En un ambiente de esterilidad, con ayuda de unas pinzas y un bisturí con una hoja estéril desechable, se procedió a abrir una pequeña ventana en la tripa artificial con unas dimensiones aproximadas de 1 x 2 cm para su posterior retirada. Una vez retirada la tripa, se tomó 1 g de muestra, se introdujo en bolsas de Stomacher estériles con 9 ml de agua de peptona estéril (Bactopeptona al 1%) y se homogeneizaron durante 120 segundos a temperatura ambiente.

Se tomaron 100 µl del homogeneizado que se transfirió a un tubo Eppendorf estéril junto con 900 µl de agua de peptona y se realizaron diluciones decimales seriadas (ISO, 1998. Norma 15214).

Se hicieron recuentos de microorganismos viables totales en Plate Count Agar, de Micrococcaceae (Mannitol Salt Agar (MSA) y los correspondientes a bacterias ácido lácticas en MRS (pH 5,6).

Para ello se tomaron 100 µl de las diluciones correspondientes y se depositaron en las placas estériles añadiendo a continuación, una capa de 20 ml de agar estéril y atemperado en un baño de agua a 55°C para evitar su solidificación. En el caso del

Material y Métodos

Ágar MRS, se utilizó una doble capa. Las placas se incubaron a 32°C durante 48 horas en condiciones de aerobiosis. para su posterior recuento.

3.3.5. DETERMINACIÓN DEL CONTENIDO DE CENIZAS

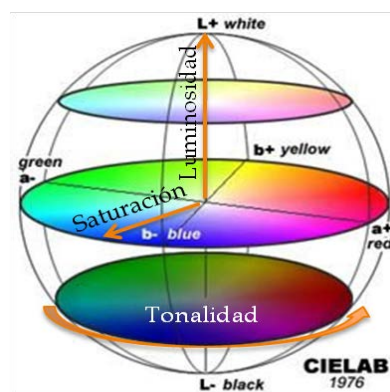
La determinación del porcentaje de cenizas se hizo de acuerdo con el método de la AOAC 927.02 (AOAC, 2005). Para ello se depositaron 5 g de muestra en cápsulas de porcelana previamente desecadas y taradas. Se introdujeron en un horno mufla a 500 °C hasta la obtención de cenizas blancas. Tras un tiempo de enfriamiento de la cabina interna del horno mufla, se volvieron a pesar las cápsulas y la cantidad total de cenizas se estimó por diferencia de peso.

El análisis se realizó por quintuplicado en cada muestra.

3.3.6. DETERMINACIÓN DEL COLOR

Para la determinación de los parámetros del color se utilizó sistema CIEL*a*b*, definido por la Comisión Internationale de l'Eclairage (CIE) en 1971.

Figura 15: Representación gráfica del sistema CIEL*a*b*



El sistema CIEL*a*b* describe todos los colores visibles al ojo humano y es un espacio de oposición de colores compuesto, basado en un sistema cartesiano de tres ejes o dimensiones:

- L*: la luminosidad. Es el eje vertical y representa la medida de dicho parámetro, variando desde el 0 (negro) hasta el 100 (blanco).
- a*: es uno de los ejes horizontales y representa la posición entre el color rojo/magenta y el verde. La escala de valores oscila entre +60 (rojo) y -60 (verde).

Material y Métodos

➤ b^* : es el otro eje horizontal y varía desde el amarillo al azul. Este eje es perpendicular al anterior (a^*). En este parámetro la escala oscila entre +60 (amarillo) y -60 (azul).

A parte de las coordenadas cartesianas anteriormente mencionadas, también es posible el empleo de las coordenadas polares, obteniendo así una variante al espacio de color CIEL*a*b*, el CIEL*C*h* (Artés y col., (2002), en el cual:

➤ Ángulo Hue o tonalidad (h^*): se calcula como la arco tangente b^*/a^* . Si el círculo de color a^*b^* se representase en una circunferencia, el origen (0°) estaría en el color estrictamente rojo (a^*) positivo siendo en ese mismo punto $b^*=0$. Desplazándose en el sentido contrario a las agujas del reloj, el color amarillo se encontrará en el ángulo 90° , el verde en los 180° y el azul en los 270° .

➤ Índice de saturación o *croma* de un color (C^*): se calcula como $(a^{*2} + b^{*2})^{0.5}$. La obtención de un valor 0 en este parámetro, indica que el color es acromático, es decir, sin ninguna tendencia al rojo, verde, amarillo o azul; mientras que, un valor alto del C^* indica la saturación de un color.

Los parámetros de color se midieron con un colorímetro digital Chroma Meter CR-400 (minolta Co., Osaka, Japón). La medición del color se realizó a temperatura ambiente sobre la superficie de productos recién elaborados (hamburguesas) o recién loncheados (cocidos y madurados) y bajo una fuente de iluminación D-65. Las lonchas fueron de 2 mm de espesor.

El colorímetro utilizado se calibró con una placa de color blanco y otra rosa cuyas coordenadas eran: L^* 44.88, a^* 25.99, b^* 6.67.

Se realizaron veinte o veinticinco medidas de cada una de las muestras.

3.3.7. ANÁLISIS DE TEXTURA

La textura de los productos cárnicos se estudió mediante dos tipos de análisis: Análisis de Perfil de Textura y Prueba de Corte (Bourne, 1978).

El texturómetro empleado fue Stable Micro System Mod. TA.XT 2i/25 (Aname, Madrid). Para realizar el Análisis de Perfil de Textura (APT) la muestra se colocó sobre una plataforma de aluminio (Mod. HDP/90). El APT se llevó a cabo con una sonda cilíndrica de 25 mm de diámetro mod. P725. La sonda utilizada para la Prueba de Corte fue la Warner-Bratzle, de aluminio (Mod. HDP/BS).

Material y Métodos

En ambos casos, las muestras fueron cilindros de 1 cm de altura y 25 mm de diámetro y se obtuvieron con un sacabocados a partir de lonchas de las muestras cortadas en el momento con el grosor mencionado. En el caso de las hamburguesas, la muestra se tomó directamente de cada una de las piezas cocinadas. Los análisis se llevaron a cabo a temperatura ambiente. El equipo se calibró siempre con una pesa de 5 Kg.

En ambos ensayos, de cada una de las muestras se realizaron entre 5 a 8 réplicas.

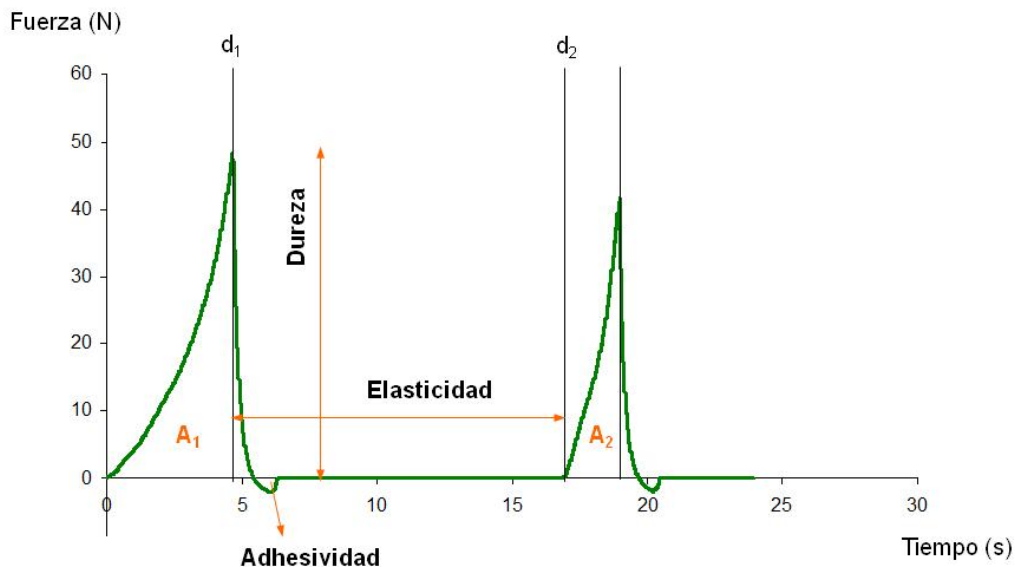
Figura 16: Texturómetro Stable Micro System Mod. TA.XT 2i/25



3.3.7.1. Análisis de perfil de textura (APT)

En el APT, también denominado ensayo de doble compresión, la muestra se comprime dos veces sucesivas hasta un 50% de la altura inicial, con el fin de simular las fuerzas de compresión que se aplican en nuestra boca al masticar un alimento. Para realizar el análisis, la muestra se coloca sobre la plataforma de aluminio para su compresión. La sonda cilíndrica utilizada baja sobre la muestra y la comprime dos veces sucesivas. La información recogida se muestra en una gráfica en la que se representa la fuerza aplicada (ordenadas) en función del tiempo (abscisas) (Figura 17). De esta gráfica se obtienen los siguientes parámetros:

Figura 17: Representación gráfica de un ensayo de doble compresión (APT).



- **Parámetros primarios:** son aquellos recogidos directamente por la sonda al realizar el análisis.
- Dureza (N): es la altura máxima obtenida en la primera compresión. Representa la máxima fuerza ejercida para producir una cierta deformación en la muestra.
- Elasticidad (cm): es la altura recuperada por la muestra entre el final de la primera compresión y el principio de la segunda. Se corresponde con la diferencia entre las alturas registradas en la muestra tras la primera compresión (d_1) y al iniciar la segunda (d_2).
- Cohesión (adimensional): Es la relación entre el área positiva obtenida durante la segunda compresión y el área positiva obtenida durante la primera. Este parámetro indica la capacidad que tiene una muestra para deformarse sin llegar a su ruptura.
- Adhesividad (N s): es el área negativa representada gráficamente justo después del primer ciclo de compresión. Este parámetro indica la fuerza necesaria por la muestra, para separarse de la superficie compresora de la sonda, después de haberla comprimido una vez.

- **Parámetros secundarios:** son aquellos obtenidos a partir de los parámetros primarios anteriormente descritos:
- Gomosidad (N): representa la fuerza necesaria para desintegrar una muestra semisólida antes de tragarla y se define como el producto entre la dureza y la cohesión.
- Masticabilidad(N): es un parámetro definido como el producto de la gomosidad y la elasticidad. Representa el trabajo necesario para masticar una muestra sólida dejándola lista para tragar.

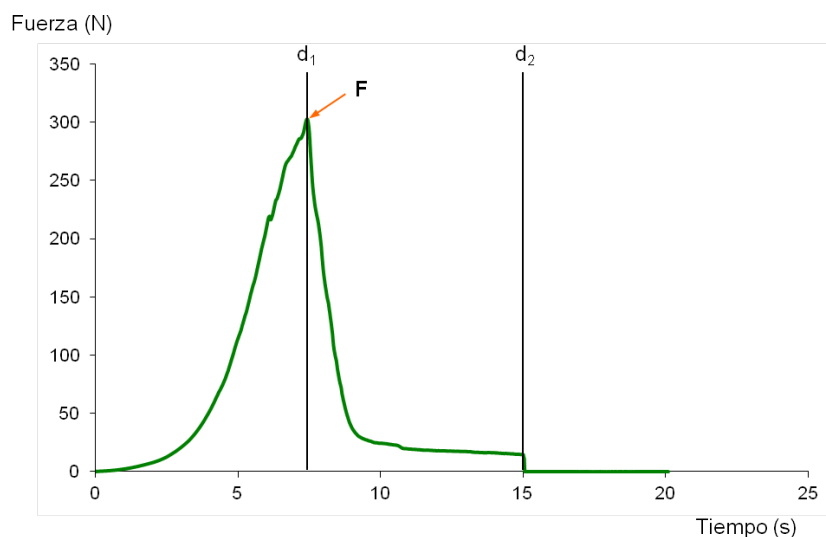
Las condiciones establecidas para el estudio de TPA fueron:

- Velocidad de la sonda en compresión: 2,0 mm/s
- Velocidad de la sonda al subir: 10,0 mm/s

3.3.7.2. Prueba de Corte

En el estudio del corte de nuestras muestras, se empleó una sonda Warner-Bratzler de aluminio que, acoplada al texturómetro, desciende una sola vez y atraviesa la muestra hasta pasar a través de la placa base donde se depositó la misma. La información recogida por la sonda se representa gráficamente, de tal forma, que la fuerza se muestra en el eje de ordenadas y el tiempo en el de abscisas (Figura 18).

Figura 18: Representación gráfica de un ensayo de corte.



Los parámetros determinados en este ensayo fueron (Bourne, 1978):

Material y Métodos

- Fuerza máxima de corte (N): es la altura máxima del área que determina la sonda al cortar la muestra e indica la fuerza máxima necesaria para poder cortar la misma.
- Trabajo de corte (N s): es el área definida por la sonda de corte al atravesar la muestra.

Al igual que en el caso del APT, antes de realizar el estudio de corte, el texturómetro se calibró con una pesa de 5 Kg. Las condiciones establecidas para este análisis fueron:

- Velocidad de corte: 2,0 mm/s
- Velocidad de la sonda al subir: 10,0 mm/s
- Distancia recorrida por la sonda tras entrar en contacto con la muestra: 3,5 cm

3.3.8. ANÁLISIS SENSORIAL

Las características sensoriales de los productos elaborados se estudiaron mediante dos tipos de análisis: un análisis preferencial y otro hedónico. En el caso de las hamburguesas crudas, se realizó además un análisis visual descriptivo (Anchored Descriptive Analysis).

a. Cabinas de análisis

El análisis sensorial se realizó en la sala de catas del Departamento de Nutrición, Bromatología y Tecnología de los Alimentos, construida según la Norma ISO 6658 (ISO, 2005). Está compuesta de 6 cabinas independientes entre sí y comunicadas con una zona de distribución mediante tornos. Cada cabina está dotada de una mesa de trabajo, una pila con agua corriente y una fuente de iluminación artificial, ya sea de color rojo o blanco según el tipo de análisis. En esta tesis doctoral, todas las muestras fueron valoradas por los catadores con luz blanca.

Figura 19: Cabina de análisis de la sala de catas del Dpto. Nutrición, Bromatología y Tecnología de los alimentos.



b. Panel de catadores

El panel de catadores estaba constituido por 35-40 catadores no entrenados y miembros del Departamento de Nutrición, Bromatología y Tecnología de los Alimentos. Sus componentes eran mujeres y hombres con edades comprendidas entre 25 y 60 años, todos ellos consumidores habituales de los productos que iban a catar.

Durante las pruebas se entregaron a cada catador las correspondientes hojas de respuesta en las que se daban las instrucciones a seguir para realizar los análisis y expresar los resultados.

Las pruebas se realizaron bajo luz blanca fluorescente y los catadores dispusieron de agua y de pan para poder eliminar el sabor dejado por la muestra anterior. Los análisis se realizaron uno por día o con un intervalo de como mínimo una hora entre uno y otro para evitar su saturación. En ningún caso, un mismo catador nunca realizó más de 3 catas consecutivas.

c. Preparación de las muestras

La preparación de las muestras fue diferente según el tipo de producto ofrecido a los catadores.

Las hamburguesas fueron analizadas tanto en fresco como cocinadas. Las hamburguesas frescas, se presentaron a los panelistas recién elaboradas y en una placa de Petri. Hasta el momento del análisis, se mantuvieron tapadas y en frío.

Material y Métodos

Para su cocinado, las hamburguesas se depositaron en una plancha precalentada a 180°C, y se procedió a su cocinado durante 2 minutos por cada lado.

Una vez cocinadas, se distribuyeron en las cabinas para la realización del correspondiente análisis sensorial.

En el caso de los productos cárnicos cocidos y madurados, lo primero que se hizo fue quitar la tripa con la ayuda de un cuchillo y se cortaron en lonchas de 2 mm de grosor en una loncheadora. Se colocaron 2-3 lonchas en placas de Petri (una por catador) y se mantuvieron tapadas a temperatura ambiente hasta el momento de servir las.

En todos los casos, las placas estaban marcadas con un código de 3 dígitos seleccionados aleatoriamente a partir de las Tablas de Dígitos al Azar (Pedrero y Pangborn, 1989).

3.3.8.1. Análisis Hedónico

El objetivo es conocer el nivel de agrado o desagrado que provoca en el consumidor una muestra específica (Pedrero y Pangborn, 1989). Es una prueba sencilla de aplicar y no requiere entrenamiento por parte de los catadores. Sin embargo, la información obtenida de esta prueba es cada vez de más valor para mejorar la calidad de un producto y evaluar las características organolépticas del mismo, sobre todo cuando se hacen cambios en las formulaciones (Pérez-Elortondo, 2000). Para este tipo de pruebas los catadores deben ser consumidores potenciales o habituales del producto en estudio y no deben conocer la problemática del estudio, solamente entender el procedimiento de la prueba y responder a ella.

A cada uno de los panelistas, se les adjuntó una hoja de respuesta (Figura 20) en la que se les pidió que valorasen diferentes atributos: olor, color, sabor, textura y aceptabilidad general de cada una de las muestras a analizar. Para este análisis se empleó una escala hedónica no estructurada de 10 cm, sin más descriptores que los propios extremos de la escala en la que el valor 0 se correspondía a la valoración de *Muy desagradable* y el 10, a la de *Muy agradable*. Los panelistas marcaron sobre esta escala una línea vertical en el lugar correspondiente a su valoración.

Para valorar las distintas puntuaciones, la escala hedónica se convirtió en numérica pasando a centímetros la distancia entre los dos extremos. Esta medida se

Material y Métodos

realizó para cada uno de los parámetros sensoriales.

Figura 20: Hoja de respuesta del análisis hedónico.

EVALUACIÓN SENSORIAL	
Nombre:	
Número de muestra:	
Fecha:	
Instrucciones: Enjuágese la boca con agua y coma un poco de pan antes de cada muestra, incluso antes de la primera. Fijese en el tributo organoléptico que le indica e intente, en la medida de lo posible, aislarlo de los demás y marque en función de su valoración, una línea vertical sobre la línea horizontal que determina cada atributo de calidad organoléptica. No olvide indicar el número de muestra. MUCHAS GRACIAS.	
Olor:	
Muy desagradable	Muy agradable

Color:	
Muy desagradable	Muy agradable

Sabor:	
Muy desagradable	Muy agradable

Textura:	
Muy desagradable	Muy agradable

Aceptabilidad General del producto:	
Muy desagradable	Muy agradable

3.3.8.2. Análisis Preferencial

El análisis preferencial es una prueba de ordenación cuyo objetivo es buscar cuál de las muestras es la mejor de un grupo más o menos definido (Pedrero y Pangborn, 1989). En este caso se pidió a los panelistas que ordenasen las muestras de mayor a menor en función de su nivel de preferencia. En cada uno de los productos cárnicos se hicieron tres series, una por cada sal cálcica ensayada. Cada serie constaba a su vez de cuatro muestras: el control y los lotes enriquecidos con 20%, 30% y 40% de la IDR. Las puntuaciones otorgadas a cada muestra se colocaron en orden de tal forma que a la muestra peor valorada se le dio la puntuación de 1; dos y tres puntos para las muestras intermedias y un 4 para aquella que fue colocada en primer lugar, siendo la que más gustó (Ibáñez & Barcina, 2001).

Figura 21: Hoja de respuesta del análisis preferencial.

EVALUACIÓN PREFERENCIAL			
Nombre:			
Fecha:			
Instrucciones: Se presentan cuatro muestras diferentes de _____. La prueba consiste en ordenar las muestras por orden de preferencia teniendo en cuenta la percepción sensorial global de cada una de ellas.			
_____	_____	_____	_____
Óptima			Pésima
Comentarios:			

¿Consumiría el producto?			

En tal caso, ¿cuál compraría?			

MUCHAS GRACIAS			

3.3.8.3. Análisis Descriptivo

Este análisis se realizó con el fin de valorar el aspecto visual de las hamburguesas frescas enriquecidas con calcio, utilizando como control una hamburguesa sin calcio. La escala utilizada para este análisis consta de 5 puntos, correspondiendo el valor intermedio al control (3). Los panelistas compararon el control con las muestras enriquecidas con calcio, otorgando el valor de 1 a la muestra que presentase un aspecto *mucho peor* que el control, el valor de 3 cuando la muestra fuese igual al control y de 5, cuando se considerase mucho mejor que el control. Los valores intermedios se corresponderían a unas características algo peores (2) o un poco mejores (4) que el control.

Figura 22: Hoja de respuesta del análisis visual descriptivo
(Anchored Descriptive Analysis).

EVALUACIÓN DESCRIPTIVO EN ANCLAJE

Nombre:

Fecha:

Instrucciones: Se presentan cuatro muestras diferentes de hamburguesas, siendo la número 1 un lote control, cuyo valor en la escala se correspondería con un 3. La prueba consiste en evaluar visualmente cada muestra en una escala del 1 al 5 con respecto al control; siendo el valor 1 una muestra poco parecida al control, el 3, igual al control y el 5, mucho mejor que el control. Los valores intermedios se corresponderían a una mayor similitud con el control, pero con características algo peores (2) o un poco mejores (4): Redondee el valor que le da a cada una de ellas.

Muestra nº 2:	1	2	3	4	5
Muestra nº 3:	1	2	3	4	5
Muestra nº 4:	1	2	3	4	5

Comentarios:

MUCHAS GRACIAS

3.3.9. DETERMINACIÓN DEL CALCIO

La determinación del calcio tanto en los productos cárnicos elaborados como en la leche que fue empleada como control, se hizo mediante dos técnicas: espectrometría de emisión atómica de plasma de acoplamiento inductivo (ICP-OES) de acuerdo a la metodología descrita por Ikem y col. (2002) y espectroscopia de absorción atómica (AAS) según Perales y col., 2005. El primer método se empleó para analizar el contenido en calcio de las muestras y en los estudios de diálisis mientras el segundo se utilizó para determinar el calcio en el estudio con las células Caco 2 debido a que el límite de detección es mayor en este caso.

El ICP OES se realizó en un espectrómetro Perkin-Emer DV 3300 utilizando argón como gas portador a un flujo de 1L/min. Se llevó a cabo en el Centro Apoyo a la Investigación de la Universidad Complutense de Madrid. Las muestras se desengrasaron con una mezcla de cloroformo/metanol (1/1) de acuerdo con la metodología de Hanson y Olley (1963). Posteriormente, 1,0 g de la muestra desengrasada se sometió a una digestión con 6 ml de HNO_3 y 2 ml de H_2O_2 en una unidad de digestión de microondas y diluida con 10 ml de agua desionizada. Las condiciones en la unidad de digestión fueron: 2 min- 250 W, 2 min- 0 W, 6 min- 250W, 5 min - 400 W y 8 min- 550W. Como material de referencia se utilizó proteína bovina BCR N° 184 ((Sigma -Aldrich). La determinación del calcio fue realizada por duplicado.

La AAS se realizó en un espectrómetro Perkin-Elmer 5100 a una longitud de onda de 422.7 nm, un flujo de acetileno de 1,75 L/min y un flujo de aire de 14 L/min. Las alícuotas de las muestras fueron reducidas a cenizas a 600°C durante 2-3 días en una mufla. El residuo inorgánico fue disuelto en 1M HCl. Con el objetivo de eliminar el efecto de los fosfatos, se llevaron a cabo nuevas diluciones con LaCl_3 (0,5 M HCl que contiene un 0,5% de lantano), en suficiente cantidad para obtener un contenido final de lantano de 0,2%. Las curvas de calibración se hicieron con soluciones estándar que contenían 1-14 $\mu\text{g}/\text{ml}$ de CaCl_2 en HCl al 6,5%. Como referencia se utilizó leche en polvo desnatada, CRM 063R (Sigma-Aldrich). La determinación del calcio fue realizada por triplicado.

3.3.10. BIOACCESIBILIDAD DEL CALCIO

Para estudiar la bioaccesibilidad del calcio se simuló el proceso de la digestión gastrointestinal en cuanto a tiempos, temperaturas, preparados enzimáticos (jugos

Material y Métodos

gástrico e intestinal, saliva, sales biliares) y aplicando una agitación que emulase los movimientos peristálticos (Shiowatana y col., 2006).

La absorción intestinal se simuló mediante dos métodos diferentes. En uno de ellos, se empleó un proceso de diálisis en el que la absorción intestinal se simula mediante el paso de nutrientes del producto digerido a través de una membrana de diálisis y el otro mediante el uso de cultivos celulares, concretamente, utilizando células Caco-2.

a. DIGESTIÓN GÁSTRICA

Para el desarrollo de la fase gástrica, se homogeneizaron 10 g de muestras con 50 ml de un buffer de fosfato 0,2M. El pH del homogeneizado se ajustó a 2,0 con HCl 5N. A continuación, a cada una de las muestras se le añadieron 0,33 ml de pepsina (0,16 g pepsina EC 232-629-3 / ml 0,1 N HCl) y se incubaron en agitación a 150 rpm a temperatura fisiológica (37°C, 2 h).

Transcurrido dicho periodo, la reacción enzimática se detuvo colocando las muestras en hielo durante 10 minutos.

b. DIGESTIÓN INTESTINAL

Tras la simulación gástrica, se procedió con la simulación de la fase intestinal. Esta última fase, varió dependiendo de si el estudio se realizó con membrana de diálisis o si, por el contrario, el estudio de biodisponibilidad finalizó con la simulación del paso del calcio a través de las células Caco-2.

3.3.10.1. Método de diálisis

Se tomaron 20 g del digerido gástrico y se le añadieron 5 ml de un conjugado de pancreatina-bilis (0,2 g de pancreatina de páncreas porcino EC 232-468-9 y 1,25 g extracto de bilis de cerdo EC 232-369-0 en 50 ml de NaHCO₃ 1M). El pH se ajustó a 7-7,5 con unos 15-25 ml de NaHCO₃ 2M y se midió el volumen total del digerido, obteniéndose un volumen final de 35-50 ml aproximadamente.

Otra alícuota de 20 g procedente del digerido gástrico, se puso en un matraz Erlenmeyer y se introdujo la membrana de diálisis en cuyo interior se pusieron 25 ml de agua destilada y la misma cantidad de NaHCO₃ 2M determinada previamente para neutralizar el pH ácido de la muestra. El matraz se incubó a 37°C en agitación (130

Material y Métodos

rpm) hasta que la muestra alcanzase un pH de 5.0. Finalmente, una vez alcanzado el pH mencionado, se añadieron 5 ml del conjugado de pancreatina-bilis y se continuó con la incubación a la misma temperatura durante 2 h. Al terminar el proceso de diálisis, se establecieron dos fases: el dializado (líquido presente en el interior de la membrana), que contendría el calcio que teóricamente atravesaría el epitelio intestinal y sería el calcio biodisponible, y el no dializado (líquido que queda fuera de la membrana más el residuo sólido) que se correspondería con el calcio no dializado y, en consecuencia, con el que no estaría disponible para su absorción. El volumen de ambas fases fue retirado y se determinó la cantidad de calcio en cada una de ellas, empleando la técnica de ICP-OES.

La bioaccesibilidad del calcio se expresó como:

$$\text{Bioaccesibilidad (\%)} = [\text{Ca dializado (mg)} / \text{Ca muestra (mg)}] * 100$$

3.3.10.2. Línea celular Caco-2

Para determinar la biodisponibilidad del Ca mediante el cultivo de células Caco-2, se siguió el proceso descrito por Jovani y col. (2001); Dendougui y Schwedt (2004) y Frontela (2007). Para ello, la fase gástrica se centrifugó a 4000 rpm durante 1 h a 4°C, utilizando tubos de polipropileno de 50 ml de capacidad. Se separaron el sobrenadante y el sedimento por separado y se almacenaron en viales de cristal a -20°C hasta su posterior análisis. El sobrenadante se correspondería al calcio que estaría disponible para ser absorbido mientras que el sedimento contendría el calcio que es retenido y que, en consecuencia no estaría disponible para su absorción. De esta forma, la fracción biodisponible queda más limpia y así se evita el daño que los restos de digerido pudieran ocasionar a la línea celular. De acuerdo con las recomendaciones de varios autores, el pH final de las muestras presentó un valor comprendido entre 6,4 y 6,7 (Jovaní y col., 2001; Perales y col., 2005). En este estudio se utilizó como control leche desnatada UHT.

Figura 23: placa con Células Caco-2

(http://www.aretaint.com/images/stories/ARETA_products/caco2.jpg)

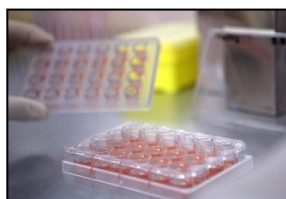
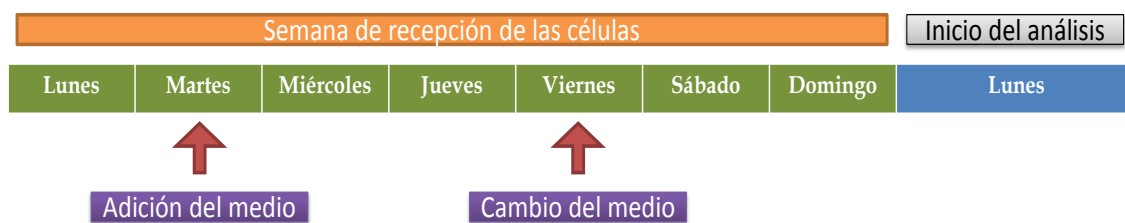


Figura 24: Monocapa de células Caco-2 polarizadas



Para el estudio de la biodisponibilidad se utilizó el kit CacoReady™ (AdvanCell ©, Barcelona, España). El kit consiste en soportes permeables HTS Transwell que contienen una monocapa de células Caco-2 diferenciadas y polarizadas. Las células van dispuestas sobre filtros microporosos de polycarbonato (0,4 micras de diámetro de poro) en placas Millicell de 96-pocillos (3,18 mm de diámetro, 0,11 cm² de área). El esquema seguido para la realización del ensayo fue el siguiente:

Figura 25: Esquema de recepción de las células e inicio del ensayo.



Protocolo de utilización de las células Caco-2:

a. Cambio de medio

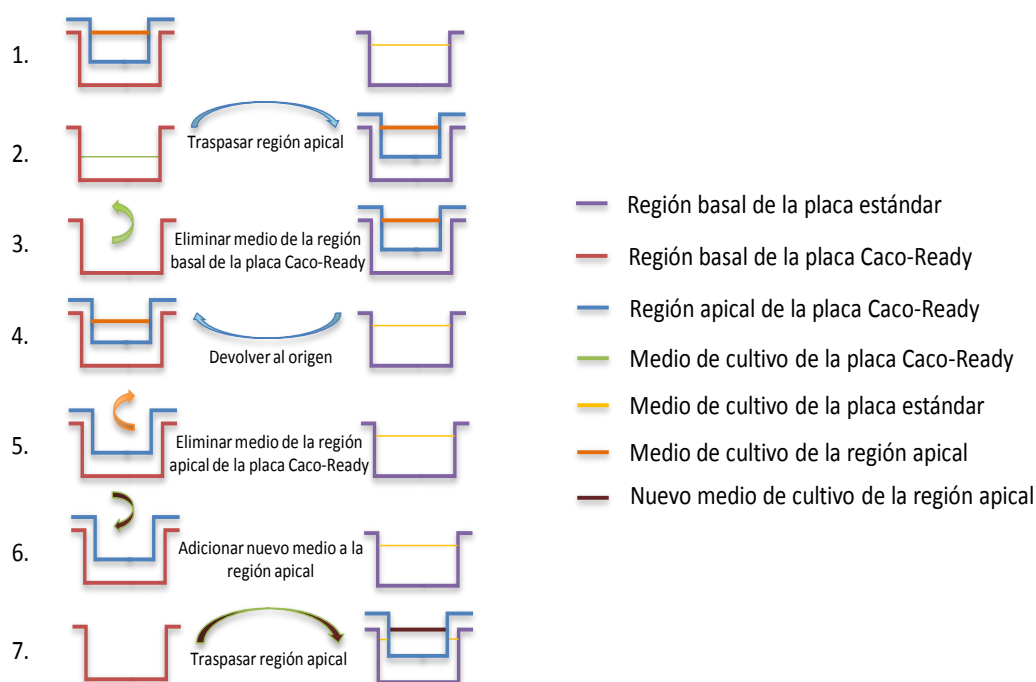
Las placas se recibieron el día 16-17 de crecimiento de las células y se mantuvieron a temperatura ambiente hasta el día 18. En este momento, se procedía a realizar la licuación del medio de cultivo mediante el uso del incubador de células a 37°C en una atmósfera de 95% de Humedad y 5% de CO₂, durante 4 horas.

El medio de cultivo en el que se recibieron las células pierde sus propiedades nutritivas a las 48 h, por ello tras la licuación del mismo, fue retirado y sustituido por otro medio DMEM recién preparado que aporte los nutrientes necesarios para el mantenimiento celular. La cantidad requerida fue de 900 µl de medio precalentado a 37° C por cada pocillo. Previo a su retirada, las placas se lavaron tres veces con el buffer

Material y Métodos

Hank's Balanced Salt Solution (HBSS) con calcio y magnesio para iniciar su período de incubación.

Figura 25: Esquema del cambio de medio



Tras el cambio de medio, las células se introdujeron en un incubador durante 20 días, tiempo suficiente para favorecer el crecimiento de la monocapa y adquirir el grado máximo de diferenciación. Es, en este momento, cuando las células adquieren las mejores propiedades para estudiar el paso de los nutrientes, en este caso de calcio, a través de la membrana.

b. *Evaluación de la integridad de la membrana a través de la medición de la resistencia transepitelial (término anglosajón "transepithelial resistance": TEER)*

Antes de realizar el ensayo con la monocapa de Caco-2, era importante conocer el estado de la permeabilidad celular para comprobar que todas las células se encontraban en su estado óptimo. Para ello, se utilizó el polarímetro Millicell® ERS-2 con los electrodos MERSSTX01 que fueron previamente esterilizados con alcohol al 70° durante 30 minutos y calibrados durante 20 minutos, con el mismo medio de cultivo Caco-2, que estaba previamente precalentado a temperatura ambiente. La resistencia

Material y Métodos

transepitelial de la monocapa se midió en $\Omega \text{ cm}^2$. La superficie activa de la membrana era de $0,33 \text{ cm}^2$.

Para realizar las medidas, el electrodo más largo se colocó en contacto con la cámara basal y el más corto con la apical. De acuerdo a las instrucciones del kit CacoReady™, tras medir la permeabilidad de la membrana en 5 de los 24 pocillos que componen la placa, la integridad de la misma se considera adecuada si el valor de TEER es superior a $1000 \Omega \text{ cm}^2$. Este valor indica que la barrera celular es aceptable y por lo tanto, el ensayo podría llevarse a cabo en las condiciones óptimas.

c. Protocolo para el estudio de biodisponibilidad a partir de los productos cárnicos enriquecidos con calcio.

Con el fin de evitar una manipulación innecesaria de la placa con el cultivo celular, y por comodidad de manejo, se decidió hacer el estudio en la dirección apical-basal, es decir, la muestra se depositó en la cámara apical, que simularía el lumen intestinal para que, tras realizar el transporte a través de la célula se recuperase en la cámara basal, que contendría el calcio bioaccesible a partir de la muestra analizada.

Para ello, los sobrenadantes procedentes de la fase intestinal obtenidos tras la centrifugación, fueron analizados por AAS. Dicho análisis permitía conocer la concentración del calcio presente en las muestras que iban a ser sometidas al ensayo de permeabilidad con las Caco-2.

El primer paso fue conocer la citotoxicidad del calcio, con el fin de realizar el ensayo con la cantidad máxima que no fuese tóxica para las células y que facilitase la determinación del calcio tras el ensayo. Para ello, se determinó en primer lugar la cantidad de calcio de los sobrenadantes obtenidos tras la digestión gastrointestinal de las muestras de los productos cárnicos enriquecidos. Una vez conocida, las muestras fueron diluidas con el tampón HBSS precalentado a 37°C a una concentración no superior a $50 \mu\text{M}$, concentración que se estimó suficientemente alta como para provocar la muerte celular por osmosis, como se pudo comprobar en ensayos previos a través de la medición de la resistencia transepitelial. Así pues, en base a las instrucciones del kit CacoReady™, valores superiores a $1000 \Omega \text{ cm}^2$ indican una buena integridad celular, por lo que, la máxima concentración ensayada en nuestros estudios fue de 40 mM , que cumplían con las especificaciones mencionadas anteriormente. A parte de esta concentración, también fueron estudiadas las del 10 y $20 \mu\text{M}$.

Material y Métodos

Para llevar a cabo el ensayo, se retiró todo el contenido de medio de cultivo presente en la región basal de la placa de cultivo para realizar un lavado con HBSS precalentado a 37° C. Posteriormente, se añadieron 750 µl de HBSS en cada uno de los pocillos lavados. Así mismo, se procedió a aspirar parte del medio de cultivo de la región apical donde se encontraba la monocapa con la ayuda de una pipeta, ya que siempre es necesario dejar un remanente de aproximadamente 70 µl para proteger las células de muerte por osmosis. Al igual que en la cámara basal, se realizó un lavado de la apical, empleando 200 µl del buffer HBSS. Una vez preparado así el cultivo celular, se depositaron 180 µl de la muestra previamente diluida.

A continuación, las placas se llevaron al incubador de células a 37°C con un 5% CO₂ y 95% de Humedad Relativa durante los periodos de tiempo estipulados para el ensayo: 0, 60 y 90 min. Como control, se utilizaron los pocillos que contenían tan sólo medio de cultivo para Caco-2 y sin incubar (tiempo 0).

Al finalizar la incubación, se recuperaron las muestras de los compartimentos basales con una pipeta y se llevaron a tubos eppendorf, manteniéndolos en refrigeración (4°C) hasta su análisis por AAS para determinar el contenido de calcio, en base a lo indicado por Perales y col., (2005).

Los volúmenes tomados en cada una de las muestras fueron de 250 µl de la región apical en el caso de los blancos y de 50 µl de la región basal, en el resto de las muestras a los tiempos estipulados.

La permeabilidad de los compuestos se determinó como coeficiente de permeabilidad aparente

d. Determinación del Coeficiente de Permeabilidad Aparente

Tras la cuantificación de los componentes de la muestra, se calculó el coeficiente de permeabilidad aparente (PAPP), es decir, el flujo del fluido a través de la monocapa celular. Este coeficiente permite establecer una correlación entre la absorción de un componente a través de la membrana de las células Caco-2 y la absorción que tiene lugar en el intestino humano. Se expresa en cm/s. Éste parámetro fue calculado en base a la siguiente fórmula (Irvine y col., 1999).

$$Paap = dQ / dt * A * C_0$$

Material y Métodos

Donde:

- dQ: cantidad presente en la región basal.
- dt: tiempo en el que se ha obtenido dQ.
- A: área de la monocapa transwell (cm²).
- C₀: concentración inicial del producto aplicado en el compartimento apical (nmol/ml).

Basado en estudios de correlación *in vitro/in vivo*, (CacoReady™, 2010) el rango de predicción de la absorción será bajo (0-20%) si el Papp es menor que 10⁻⁶ cm/s; mientras que si el Papp está comprendido entre 10⁻⁶ y 10 x 10⁻⁶, será medio (20-70%) y será alta (70-100%) cuando ésta sea superior a 10 x 10⁻⁶.

e. Determinación del contenido en calcio

El contenido de calcio en las diferentes fases fue expresado como mg/100 g de producto y fue calculado como a continuación se indica:

- Contenido de calcio en la Fase Gástrica:

$$\% \text{ Ca en FG} = [\text{Ca determinado en la FG} / \text{Ca en el producto}] * 100$$

- Calcio disponible: Calcio determinado en el sobrenadante obtenido tras la centrifugación la fase intestinal. Se corresponde con el calcio que se libera de la matriz en el tracto gastrointestinal y que estará disponible para ser absorbido después de la digestión del productos.

$$\% \text{ Ca Disponible} = [\text{Ca determinado en la FI} / \text{Ca en el producto}] * 100$$

f. Determinación del porcentaje de transporte

El porcentaje de transporte es la cantidad de calcio (%) que cruza la membrana celular.

$$\text{Porcentaje de transporte (\%)} = [T / C_0] * 100$$

Donde:

- T: es la diferencia entre la cantidad de calcio en la cámara basal y el buffer de transporte (blanco).

➤ C_0 : la cantidad total de calcio de las muestras que son añadidas a la cámara apical del kit.

3.3.11. ANÁLISIS ESTADÍSTICO

En todos los casos, los datos se sometieron a un análisis de varianza (ANOVA) de una o de dos vías en función del planteamiento del experimento. En el ANOVA de dos vías, los factores a estudiar fueron el tipo de producto y la sal cálcica. El efecto de la matriz cárnica se analizó con un ANOVA de una vía, en el cual, el factor independiente fue la sal cálcica y el dependiente, el producto cárnico elaborado.

Así mismo, se hizo un Análisis de Componentes Principales (ACP). Se trata de un análisis multivariado que permite resumir la mayor parte de la variabilidad de un elevado número de datos en unas cuantas variables denominadas “componentes principales” (CP) (Arvanitoyannis y Houwlingen-Koukaliaroglou, 2003).

Los resultados de este análisis estadístico, fueron representados en una gráfica bidimensional en donde el Componente Principal 1 (CP1) se representa en el eje de abscisas y Componente Principal 2 (CP2) en el de ordenadas. Los atributos vienen representados por vectores y de su longitud depende la importancia de cada uno de ellos; de tal forma, que los vectores más largos representan a los atributos más importantes y los más cortos, por el contrario, a los menos importantes.

El software utilizado para este estudio fue el Statgraphics Centurion XVI.I (Statistical Graphics Corporation, Herndon, VA, USA). El nivel de significancia en todos los análisis estadísticos realizados, se estableció en $p < 0,05$.

Capítulo 4: TRABAJO EXPERIMENTAL

Capítulo 4: Trabajo experimental

El objetivo general de este trabajo ha sido diseñar y desarrollar productos cárnicos enriquecidos con diferentes sales de calcio y estudiar su biodisponibilidad mediante ensayos *in vitro*.

Se han ensayado tres sales cálcicas seleccionadas en base a su solubilidad/bioaccesibilidad y se han incorporado en diferentes concentraciones en función de su composición molecular y el porcentaje de IDR de calcio que se pretendía alcanzar. Estas sales cálcicas se han probado en tres tipos de productos cárnicos, frescos, cocidos y madurados.

En los productos experimentales se ha valorado la influencia de cada una de las sales y de las concentraciones ensayadas en las características tecnológicas y sensoriales, buscando siempre un equilibrio entre estas características y la máxima concentración de calcio.

Finalizado el desarrollo de los productos se pasó a estudiar la bioaccesibilidad mediante un método de diálisis. Una vez obtenidos resultados preliminares se procedió a realizar el estudio con células Caco-2, sólo en aquellos productos enriquecidos con los mayores porcentajes de IDR y que presentaron buenas características tanto tecnológicas como sensoriales. Los resultados obtenidos se muestran a continuación en el orden en que se diseñaron los experimentos.

4.1. Technological and sensory properties of hamburgers enriched with calcium.

Study of the *in vitro* bioavailability.

4.2. Sodium chloride influence on the technological and sensory properties of hamburger patties enriched with calcium.

4.3. Calcium bioaccesibility and technological properties of enriched cooked sausages

4.4. Technological and sensory properties of calcium enriched dry fermented sausages. Study of the calcium bioavailability.

4.5. Bioavailability of calcium from enriched meat products using Caco-2 cells.

4.1. Technological and sensory properties of hamburgers enriched with calcium.

Study of the *in vitro* bioavailability

Italian Journal of Food Science (2015), vol. 27: 1-9

TECHNOLOGICAL AND SENSORY PROPERTIES OF HAMBURGERS ENRICHED WITH CALCIUM STUDY OF THE *IN VITRO* BIOAVAILABILITY

ANA M. SOTO, M. LUISA GARCÍA and M. DOLORES SELGAS*

Dpto. Nutrición, Bromatología y Tecnología de los Alimentos, Faculty of Veterinary,
University Complutense, Avda. Puerta de Hierro s/n. 28040 Madrid, Spain

*Corresponding author: Tel. +34 91 3943745; Fax: +34 91 3943743,
email: selgar@vet.ucm.es

ABSTRACT

Hamburgers were supplemented with three calcium salts (calcium gluconate CG, calcium lactate CL and calcium citrate-malate CCM). They were added in sufficient amount to that 100 g of hamburger gives 20 or 30% of the Ca RDA (1000 mg). Their technological and sensory properties were studied. CG 30% gave the worst sensory properties and it was discarded. Bioavailability of calcium depends on the type of salt used and the highest value was obtained with CCM (14.5%). For that, this salt is proposed as the most adequate for the enrichment of fresh meat products.

- Keywords: bioavailability, calcium salts, hamburgers -

INTRODUCTION

Meat and meat products are important to the human diet; they contain proteins with all nine essential amino acids of high biological value, accounting for 40% of total amino acids. They are an excellent source of bioactive compounds, including vitamins (B-complex), iron, zinc, phosphorus (FERNÁNDEZ *et al.*, 2005; WEISS *et al.*, 2010).

The interest on the human health and the actual consumer tendencies, who prefer more nutritious food, have stimulated interest in developing meat products with bioactive compounds with attractive physiological activities (GRIGUELMO *et al.*, 1999; CENGİZ and GOKOGLU, 2005; DECKER and PARK, 2010). Greater emphasis has been placed on strategies involving the addition of bioactive compounds with recognized health benefits, such as proteins, fibre, polyphenols, unsaturated fatty acids, probiotics or minerals (ROBERFROID, 2002; SAIGA *et al.*, 2003; CACERES *et al.*, 2006; ARHIARA, 2006; JIMÉNEZ-COLMENERO *et al.*, 2006; DECKER and PARK 2010; ALONSO *et al.*, 2010; ZHANG *et al.*, 2010; KHAN *et al.*, 2011). Dietary minerals are essential for various physiological functions and they have been associated with the prevention of several diseases (MENÉNDEZ-CARREÑO *et al.*, 2008; DECKER and PARK, 2010; ZHANG *et al.*, 2010). Calcium (Ca) is one of the most important. It gives structural integrity to mineralized tissue preventing osteoporosis and contributing to the "bone health". Although interest in Ca primarily derives from this role, it also plays other essential physiological roles in arterial hypertension, cellular function, skeletal muscle contraction, blood coagulation and enzymatic reactions as a co-factor (PRINCE *et al.*, 2006; STRAUB, 2007; ADLURI *et al.*, 2010). Health authorities have recommended a Ca daily allowance (RDA) of 1000 mg for adults aged 19-50 (Institute of Medicine, IOM, 2004) or 800 mg (Directive 2008/100/EC), without concern for age.

Milk and dairy products account for much of the Ca in the human diet, (75% of Ca intake, approx); only 16% comes from fish and vegetables and a 6-7% from mineral water (GUÉGUEN and POINTILLART, 2000; CHAROENKIATKIU *et al.*, 2008). Since meat and meat products are poor source of Ca, supplementing them with Ca salts could be a good option to increase its intake particularly those in which the consumption of milk can be a health problem. Previous studies have examined the addition of Ca to meat products, but mainly for reducing sodium levels (GIMENO *et al.*, 1998, 1999) and the final Ca content was not sufficient to consider them as a source of this mineral. Studies previously performed in our laboratory (CÁCERES *et al.*, 2006), it was reported that calcium could be successfully added to both cooked and dry-fermented sausages,

but until now, fresh meat products have been not assayed.

In this way, the present work deals with the manufacture of fresh meat products (hamburgers) enriched with calcium. For that, three different calcium salts were assayed: Ca gluconate (CG), Ca lactate (CL) and Ca citrate-malate (CCM). They are permitted in food (Regulation EC No 1907/2006) and characterized because of their high bioavailability (KORSTANJE and HOEK, 2001). The technological and sensory properties of the hamburgers manufactured were studied and finally, a study of the Ca bioavailability have been performed, using an *in vitro* static method to simulate the passage through the intestinal cell-membrane (GLAHN *et al.*, 2002; PERALES *et al.*, 2005; SHIOWATANA *et al.*, 2006).

MATERIAL AND METHODS

Hamburger manufacture

Beef meat was obtained from a local abattoir and chopped in a grinder using a 3 mm plate (Grinder C10, Falsf Co., Spain). The Ca salts (Panreac, Castellar del Vallés, Spain) were added separately to the ground meat in sufficient amount to give a final Ca content of 20 or 30% of the RDA (1000 mg/day) (IOM, 2004). These calculations took into account the calcium content of the molecules and the purity of the Ca salts, which was >98% based on the anhydrous formula (Table 1). The Ca salts were homogeneously distributed into the ground meat in a mixer (Mainca, Pamplona, España). Then, hamburgers were moulded into plates (10 cm diameter, 1 cm height) and kept under refrigeration (2 °C) until analysis, less than 24 h.

Seven batches were manufactured: a control batch without Ca and 6 batches added with CG, CL or CCM at two concentrations (20 and 30% RDA). According to the type and Ca salt amount, the batches were named as CG20, CG30, CL20,

Table 1

Calcium salt amount added to raw hamburgers to provide 20 or 30% of the RDA	
Batch	g/100 g
Control	0
CG20	2.24
CG30	3.36
CL20	1.54
CL30	2.31
CCM20	0.93
CCM30	1.40

CL30, CCM20 and CCM30. The hamburgers manufacture was made in triplicate.

Hamburgers were cooked on an electric grill preheated to 180 °C. They were placed for 2 min on each side, sufficient time to achieve a temperature of 60 °C in the inner of the hamburger and a good final degree of doneness (THORNBURG, 2005). Temperature was controlled using a digital thermometer (Testo Mod 735, Barcelona, Spain).

Physico-chemical analyses

Water activity was determined with a Decagon CX1 dew point hygrometer (Decagon Devices, Pullman, WA, USA). The pH was measured using a Crison 2001 pH meter using a glass electrode and according to the AOAC (2011). Water-holding capacity (WHC) was tested according to ZAMORANO and GAMBARUTO (1997). For that, a sample of 0.1 g was placed on a filter paper (Whatman No. 2), sandwiched between translucent plastic plates, and pressed for 1 min. The meat area and liquid area on the filter paper were measured with a planimeter. The following formulae were applied for WHC:

$$\text{WHC} = [\text{area of liquid (cm}^2\text{)} - \text{area of meat (cm}^2\text{)}] \times [9.47 / \text{moisture in sample (mg)}] \times 100$$

The measurements were made in quintuplicate and the final result was the average value.

Colour analysis

Colour was measured at room temperature on the surface of raw hamburgers, using a Chroma Meter CR-200 colorimeter (Minolta Co., Osaka, Japan) according to the Space colour CIE $L^*a^*b^*$ system and calibrated with a rose tile ($L^* 44.88$, $a^* 25.99$, $b^* 6.67$). A D-65 illumination source was used. L^* , a^* , b^* , Hue angle (tonality) and Saturation index (vivacity) were estimated according to ARTÉS and MÍNGUEZ, (2002). For each batch, twenty five measurements were taken.

Texture analysis

Textural properties were determined using a texturometer Stable Micro System Mod. TA.XT 2i/25 (Surrey, UK). Texture Profile Analysis (TPA) was performed on central cores of cooked hamburgers which were compressed twice to 50% of their original height. A cylindrical probe (2.5 cm diameter) of aluminium was used for the assay. The following parameters were determined: Hardness (N), Springiness (cm), Cohesiveness (ratio), Adhesiveness (N s), Gumminess (N) and Chewiness (N cm) (BOURNE, 1978). Shear force (N) and Work of shearing (N s) were estimated using a Warner-Bratzler blade. In both tests, the samples were 1 cm high and 2.5 cm in diameter; the crosshead speed was 2 mm/s. All determinations were carried out in quintuplicate for each batch.

Sensory analyses

The taste panel consisted of forty untrained assessors selected according to their eating habits, acquaintance with the product to be analyzed and sensitivity, as well as the reproducibility of their evaluations.

First, an Anchored Descriptive Analysis was performed in which the assessors evaluated the similarity between the external appearance of the enriched raw hamburgers and the control batch. This test was performed under a D-65 illumination source using a 5-point descriptive scale, in which the value of 3 points corresponded to the control batch. The value of 1 point meant *much worse than the reference*; 5 points, *much better than the reference*; 2 and 4 points were intermediate values. Three series were prepared: Control-CG20; Control-CL20-CL30 and Control-CCM20-CCM30. The series were presented to the panellists with 30 min of difference to avoid subjectivities.

After this test, a Hedonic Test was performed with cooked hamburgers. In this case the taste panel consisted by 15 trained panellists. They were in individual booths constructed according to ISO DP 6658 (ISO, 1985), under white fluorescent light. The assessors evaluated different attributes (odour, colour, texture, taste and overall acceptability) using a 10 cm non-structured scale (0 = extremely dislike and 10 = extremely like). Two sessions per day were carried out with an interval of at least 1 h between them to avoid panellist fatigue. Unsalted crackers and room-temperature water were provided to clean the palate between samples. The hamburgers were cooked and served in transparent Petri dishes. In each session three randomly selected hamburgers were served.

Bioavailability

Calcium bioavailability was studied using a static *in vitro* test that simulates the gastric and intestinal phases of the digestion process according to the methodology of SHIOWATANA *et al.*, (2006). All enzymes were from Sigma-Aldrich (Steinheim, Germany) and the reactives from Panreac (Barcelona, Spain). The samples were 10 g of cooked hamburgers which were homogenised (Polytron®, Littau-Luzerne, Switzerland) with 50 ml of 0.2 M phosphate buffer. The pH was adjusted to 2.0 with 5 N HCl. To simulate the gastric phase, 0.33 ml of suspension of pepsin (0.16 g pepsin (EC 232-629-3) per ml 0.1 N HCl) was added. Then, the samples were incubated in a shaker (130 rpm) at 37 °C for 2 h (Thermo Scientific MaxQ4000, Iowa, USA).

To simulate the intestinal phase, 20 g of the gastric digest was mixed with 5 ml of pancreatin-bile conjugate, [0.2 g pancreatin from porcine pancreas (EC 232-468-9) and 1.25 g porcine bile extract (EC 232-369-0) in 50 ml 1 M

NaHCO₃]. The pH was adjusted to 7-7.5 with 2 M NaHCO₃ and the total volume of the digest was measured.

Distilled water (25 ml) and the same volume of 2 M NaHCO₃ determined before were added inside to a cellulose dialysis tube with a molecular weight cut-off of 12000-14000 Da and a diameter of 25 mm (Sigma Aldrich, Steinheim, Germany). The tube was introduced into a flask containing other 20 g aliquots of the gastric digest and it was incubated at 37 °C in a shaker (130 rpm) until the pH reached a value of 5. Then, 5 ml of pancreatin-bile conjugate was added to the gastric phase and it was incubated again during 2 h at 37 °C.

After the dialysis process, the dialyzed calcium (inside the dialysis tube) and the non-dialyzed calcium (outside the dialysis tube) were determined. This last one, beside with the calcium in the solid delivery, corresponds to the calcium that would be eliminated. The difference between the amount of calcium detected in these two phases and that determined in the gastric phase was considered as the calcium remaining in the solid residue (solid delivery) and would be eliminated with the feces. It was calculated by difference.

The percentage of bioavailability was expressed as follows:

$$\text{Bioavailability (\%)} = [\text{Dialyzed Ca (mg)} / \text{Ca sample (mg)}] * 100$$

Calcium determination

Calcium levels were determined according to IKEM *et al.*, (2002). For microwave digestion, 1.0 g of each sample was subjected to an acid digestion with 6 ml of HNO₃ and 2 ml of H₂O₂ (Suprapure, Merck) in a microwave digestion system and diluted to 10 ml with deionised water (Milli-Q, Millipore). Blank digestion was carried out in the same way. Digestion conditions for the microwave system were the following: 2 min - 250 W, 2 min - 0 W, 6 min - 250 W, 5 min - 400 W and 8 min - 550 W. A Perkin Elmer DV 3300 inductively coupled plasma-optical emission spectrometry (ICP-OES) was used to analyze the calcium level in the digested samples. Bovine muscle BCR No 184 was used as reference (CÁCERES *et al.*, 2006). Experimental values obtained were in the range of the certificate value with its uncertainty. All determinations were carried out in duplicate.

Statistical analyses

Results were statistically analysed by two-way ANOVA, which factors were represented by type and concentration of calcium salt. Values of $p < 0.05$ were considered to be significant. The effect of the panellists in the sensorial responses was removed by rescaling all the scores given

by each assessor from 0, which represents the minimum score used by a given assessor, to 10, which is the maximum score used by that assessor. After rescaling, the effect of the assessors in the sensorial responses was analysed by a two factor analysis of variance according to a randomised balanced block experimental design. The factor represented the type and percentage of calcium salt, while the block variable had 15 levels representing each of the panellists that collaborated in the trials. The F test showed that the effect of the panellists was not significant ($P > 0.05$). In consequence, the final model considered of only 1 factor (one-way ANOVA) representing the calcium salt content.

Statistical analyses were performed using the Statgraphics Centurion XVI.I (Statistical Graphics Corporation, Herndon, VA, USA).

RESULTS AND DISCUSSION

Physico-chemical parameters

Table 2 showed the results of the a_w and pH of the batches manufactured. The a_w of the reminded batches ranged between 0.945 and 0.989 and no significant differences were observed between control and calcium added batches. CL batches showed the lower values. The lower pH values corresponded to the CG20, CL20 and CL30 batches, which showed a pH of 5.70, 5.55 and 5.50, respectively. They differ significantly to the reminder batches. According to the FDA (FDA, 2014) these values assure the safety of these meat products.

GC30 values are not showed due to its technological attitude like it was explained in the following section (Colour parameters).

WHC showed similar values in all the batches and ranged between 36.0-39.0%. The addition of whichever calcium salts supposed no significant changes in the WHC ($p > 0.05$).

The values of all these parameters are according to those reported for several authors in raw

Table 2

Effect of added calcium salts on water activity (a_w) and pH on of raw hamburgers		
Batch	a_w	pH
Control	0.966±0.016 ^{AB}	5.80±0.02 ^B
CG20	0.958±0.027 ^{AB}	5.70±0.05 ^C
CL20	0.954±0.030 ^B	5.55±0.02 ^D
CL30	0.945±0.031 ^B	5.50±0.10 ^D
CCM20	0.989±0.037 ^A	5.86±0.04 ^{AB}
CCM30	0.955±0.013 ^{AB}	5.92±0.06 ^A

or ground meat (LAWRIE, 1998; LEE *et al.*, 1998; POULANNE and HALONEN, 2010).

Colour analysis

The worse results were obtained with the CG batches. The CG crystallized in contact with the water of the meat and formed visible small white crystals that appeared homogeneously distributed in the hamburger. These crystals gave an external appearance different to that usually expected by the consumers in a commercial hamburger. It was especially striking at the maximum concentrations (CG30) because the crystals were larger and numerous. For that, it was considered that this batch didn't have enough quality and it was discarded for this and the following tests. Batch with CG20 also had crystals, but they were smaller, as white dots. Therefore, it was considered adequate for continuing the experiment, although its visual appearance would be compromised.

Colour parameters (L^* , a^* and b^*) were determined in raw hamburgers (Table 3). The differences observed were related to the type of salt added. Lightness was very similar in all the batches without significant differences ($p < 0.05$). However, it can be observed as the L^* parameter was slightly higher in batches manufactured with CL, while, the lower values corresponded to those manufactured with CCM. It is important to remember that CL batches were those that showed the lower pH values. The relationship between color and pH is widely accepted (MANCINI and HUNT, 2005) and several authors (KIM *et al.*, 2006; MANCINI and RAMANATHAN, 2008; NAIR *et al.*, 2014) have reported specifically the effects of lactate on meat color. These authors proposed that lactate plays an indirect role in color stability by generating NADH, which

is subsequently used to maintain reduced forms of myoglobin, increasing in this way, the stability of meat colour.

The values of redness (a^*) and yellowness (b^*) were similar between the control and calcium added batches. In relation to the redness, the lower values were observed in the CCM batches and the same occurs in the yellowness (b^*). The higher value was recorded in the batch CL20 but it seems to be an inconsistent data. It was described that the haem pigment contents are mainly related to a^* and, consequently, it is considered as the most important parameter in meat, while redox state influenced b^* (MANCINI and HUNT, 2005). This parameter reach less importance because colours represented (blue and yellow) are not typical or intuitively related to meat. According to these authors, and giving greater relevance to the a^* parameter, it can be concluded that the colour is very similar in all the batches, although CL20 and CCM30 batches were the only ones that showed any difference. Hue Angle and Saturation Index behaved in a similar way and these batches showed again, the only differences in relation to the remainder ones. The colour lecture of hamburgers did not reflect the presence of the small white crystals due to their size. It is important to take into account, firstly, that the colorimeter project the light from the probe, which has 1 cm of diameter and secondly, that the crystals had a much smaller size. For that, the colorimeter read the colour of the meat and thus the data of CG20 and control batches (without calcium) were similar, without significant differences.

The colour of cooked samples (data not shown) was very similar in all batches without exceptions. It has been described that during heat treatment, the meat colour changes from red to grey-brown (Maillard reaction) and increase

Table 3

Effect of added calcium on colour properties of raw hamburgers					
Batch	L^*	a^*	b^*	Hue Angle	Saturation Index
Control	44,45±1,96 ^{AB}	21,72±1,15 ^{AB}	8,37±0,88 ^{BC}	20,62±1,85 ^{BC}	23,36±1,23 ^{AB}
CG20	44,63±6,64 ^{AB}	22,60±4,96 ^{AB}	9,20±3,21 ^{AB}	21,79±4,88 ^{BC}	24,49±4,78 ^{AB}
CL20	45,68±4,35 ^A	23,36±3,46 ^A	10,76±2,53 ^A	24,74±3,81 ^A	25,72±3,95 ^A
CL30	46,60±7,54 ^A	21,39±3,44 ^{AB}	9,30±3,42 ^{AB}	23,96±6,22 ^{AB}	22,36±4,18 ^{BC}
CCM20	43,64±5,72 ^{AB}	20,34±3,36 ^{BC}	7,34±1,91 ^{BC}	19,12±3,58 ^C	21,73±3,65 ^{BC}
CCM30	41,32±5,43 ^B	19,60±3,77 ^C	7,04±2,81 ^C	19,10±6,67 ^C	20,88±4,14 ^C
Data are mean ± S.D.					
Values sharing the same letters are not significantly different ($p > 0.05$)					

the opacity when the internal meat temperature is between 45 °C and 67 °C (PAKULA and STAMMINGER, 2012). In this way, TORNBERG (2005) reported that the increase in meat opacity is related to the myosin desnaturation, which starts at about 35 °C. Above 50 °C, the myosin molecules are completely coagulated and the meat appears opaque.

Textural analyses

Textural parameters were determined in cooked hamburgers (Table 4). It was observed that in both CL and CCM batches, the higher the calcium amount, the greater the hardness was. This is probably because calcium, which is a di-valent cation, establishes bonds between meat proteins, mainly with myosin. This favors the formation of a stronger network which leads to the highest firmness (DAMODARAN, 2008). According to TORNBERG (2005) it could be also due to the relationships stabilized between calcium and

meat proteins, partially denatured by the cooking. This last one favors the formation of a more compact network that increases the hardness.

Springiness was quite similar in all the calcium enriched batches and shown higher values to batch control. According to BELITZ *et al.*, (2009), the increase of the ionic strength leads the extraction to the surface of the particles of minced meat yielding sticky exudates. During heating, the proteins interact between them, yielding a structure consist on a protein gel that can modify the springiness of the cooked products. (TORNBERG, 2005).

Adhesiveness and cohesiveness parameters did not change significantly ($p>0.05$). Gumminess and chewiness behaved as the hardness because they are secondary parameters dependent on it. So, the lower values corresponded to the CG which was the batch which showed the lower harness

The results obtained in the shear test showed the same tendency than in the TPA and so,

Table 4

Effect of added calcium salts on textural properties of experimental cooked hamburgers ^β						
Batch	Hardness (N)	Adhesiveness (N s)	Springiness (cm)	Cohesiveness (ratio)	Gumminess (N)	Chewiness (N cm)
Control	27,58±3,58 ^B	-0,03±0,004 ^A	0,51±0,01 ^C	0,60±0,01 ^A	16,52±1,95 ^B	8,25±0,97 ^C
CG20	18,16±5,86 ^C	-0,03±0,019 ^A	0,54±0,04 ^{BC}	0,52±0,06 ^B	10,19±3,67 ^C	4,99±2,07 ^B
CL20	35,07±6,34 ^A	-0,03±0,015 ^A	0,59±0,04 ^A	0,62±0,04 ^A	21,64±4,28 ^A	12,30±2,60 ^A
CL30	38,44±5,59 ^A	-0,04±0,021 ^A	0,57±0,02 ^{AB}	0,60±0,06 ^A	22,41±3,34 ^A	13,81±1,89 ^A
CCM20	27,37±6,08 ^B	-0,03±0,011 ^A	0,55±0,05 ^{BC}	0,61±0,03 ^A	16,75±3,73 ^B	9,12±1,45 ^B
CCM30	38,74±8,15 ^A	-0,04±0,021 ^A	0,56±0,04 ^{ABC}	0,60±0,04 ^A	23,30±6,08 ^A	12,04±1,57 ^A

^β Data are mean ± S.D.
Values sharing the same lower case letters are not significantly different ($p > 0.05$)

Table 5

Effect of added calcium salts on the sensory properties of raw (Anchored Descriptive Analysis) and cooked hamburgers (Hedonic Test) ^β				
Batch	Anchored Descriptive Analysis	Hedonic Test		
		Texture	Taste	Overall Acceptability
Control	3.00 [*]	6.06±1.40 ^{AB}	6.13±1.33 ^A	6.22±1.15 ^{AB}
CG20	1.87±0.21 ^D	6.24±1.80 ^{AB}	4.94±2.44 ^{AB}	5.18±2.05 ^B
CL20	2.40±0.35 ^B	7.42±3.23 ^A	5.13±2.30 ^{AB}	5.87±2.10 ^A
CL30	3.53±0.29 ^A	6.06±2.22 ^{AB}	4.56±2.30 ^B	5.33±1.97 ^B
CCM20	2.67±0.40 ^B	5.79±1.78 ^B	5.62±1.91 ^{AB}	5.38±1.99 ^B
CCM30	2.20±0.26 ^B	5.90±1.30 ^{AB}	5.60±1.33 ^{AB}	5.80±1.35 ^{AB}

^β Data are mean ± S.D.
Values sharing the same uppercase letters are not significantly different ($p > 0.05$).
^{*} Reference

the principal differences were an increase of the Work of Shearing related with the calcium amount added, independently to the salt added (data not shown).

Sensory analyses

Table 5 shows the results of the Anchored Descriptive Analysis, performed with raw hamburgers. Control batch was the reference and it was awarded a score of 3 in the 5 points scale used. The panellists evaluated the Visual Appearance of enriched hamburgers in comparison to the control.

The worse results were obtained with the CG20 batch, mainly due to the presence of small white crystals (see Colour section). In this case, the number and the size of the crystal were lower than in the CG30, but they were sufficient to modify negatively the appearance of the hamburgers.

CL30 batch was the best evaluated, even more than the reference ($p < 0.05$). This result is according to the instrumental colour measurement (Table 3) in which this batch was the one that had the greatest the higher L^* and Hue Angle.

Table 5 also shows the results of the Hedonic Test performed with cooked hamburgers. Odour and colour were well-evaluated in all the cases obtaining similar values in all batches ($p > 0.05$) (data not shown). The texture achieves punctuations higher than 6 except the batches enriched with CCM20 and CCM30 which achieved scores of 5.79 ± 1.78 and 5.90 ± 1.30 , respectively. Significant differences were observed only between CL20 and CCM20, but, in general terms it can be observed a great similarity between the enriched batched and the control batch.

However, the presence of calcium salts influenced negatively on the taste and so, independently of the type of salt or the amount added, all the enriched batches achieved punctuation lowers than the control batch.

Significant differences were observed between control and CL30 batches; the panellists described this last batch as *slightly more acidic*.

The overall acceptability values behaved similar than the taste ones and, consequently, the taste seemed to be the most influential param-

eter. So, the punctuations obtained by the acceptability were very similar in all the enriched batches, although it was observed that the lowest values were those for batches CG20 and CL30. The control batch reached the best score although the difference was not significant with CL20 and CCM30 batches. In any case none of the batches were discarded because all of them exceeded the value of 5 points.

Bioavailability

In order to facilitate the calcium analysis, it was decided to perform the bioavailability study using the batches manufactured with the higher concentration: CL30 and CCM30. The CG batches were discarded for this study because of the low sensory quality. Table 6 shows the results obtained. The bioavailability was determined in the cooked hamburgers.

The calcium amount determined was slightly higher than the expected, a 20% approximately. This increase could be due to the loose of water during the cooking as it has been reported by PAN and SHING (2001). These authors established that the water losses during ground beef cooking (60 °C, 2 min) is closed to 15-20%. The final calcium amount determined was sufficient to give the calcium levels proposed in our objective (30% RDA).

In the gastric phase was detected all the calcium presented in the cooked hamburgers.

The dialyzed calcium was close two fold higher in the hamburgers enriched with CCM30 than those with CL30. The solid deliveries calculated were 171.29 mg in the CL batch and 129.12 mg in the CCM one. This difference represents a calcium loss close to 47% and 34%, respectively. It could be due to that the CCM interferes with proteins during the cooking and contributes, as it has been described above, to the formation of a more compact protein network that could difficult the activity of pancreatin-bile complex, and to favor the retention of a higher calcium amount.

Applying the formula (see Material and Methods section), the bioavailability percentage was 7.73% for CL and 14.55% for CCM.

The variability in calcium bioavailability is

Table 6

Calcium content in the different phases of the in vitro digestion and calcium bioavailability (%) from cooked hamburgers ^a					
Calcium Salt	Sample*	Gastric Phase Ca*	Non Dialyzed Ca*	Dialyzed Ca*	Bioavailability (%)
CL30	373.65±37.36	363.95±36.53	163.82±26.14	28.84±2.20	7.73
CCM30	361.85±25.33	382.6±23.00	200.82±12.01	52.66±3.08	14.55

^a Data are mean ± S.D.
 *mg Ca/100 g hamburger
 Bioavailability (%) = [Dialyzed Ca (mg) / Ca sample (mg)]*100

consistent with numerous studies. One of the first bioavailability assays performed (MORRISEY and FLYNN, 1972) reported that the calcium absorption from cow's milk ranged from 21 to 45% in healthy human adults. RECKER *et al.*, (1988) described that the absorption of calcium carbonate from enriched whole milk, chocolate milk, yogurt, imitation milk and cheese ranged between 21-26% in postmenopausal women. KRUGER *et al.*, (2003) concluded that calcium bioavailability was similar in milk fortified with calcium carbonate or milk calcium. In a study performed by SITTIKULWITIT *et al.*, (2004) with different calcium salts and milk powder, bioavailable calcium ranged between 28.5 and 58.7%. Other authors determined calcium absorption from infant milk formula of 39% (NELSON *et al.*, 1996) and 29% from enriched orange juices (GONELLI *et al.*, 2007). CILLA *et al.*, (2011) reported calcium efficiency uptake values from 10.47-19.82% for different milk-based fruit beverages and PERALES *et al.*, (2005) found calcium bioavailability to be 5.0-31% for infant and adapted milks.

The differences reported between the values of calcium dialyzable have been also attributed to the methodology applied, particularly with regard to the amount and activity degree of the enzymes used, the pH values and incubation times during the gastric and intestinal phases. In this way, VAN der HEE *et al.*, (2009) reported that calcium absorption from food depends on numerous factors, causing a range broadly from 15 to 44%. So, bioavailability described in this paper is according to the data collected by other authors. Furthermore, our results showed that CCM would be the most bioavailable salt from hamburgers, which suggests that is the most appropriate for the enrichment of fresh meat products.

SITTIKULWITIT *et al.*, (2004) reported that the dialysis rate of calcium (calcium bioavailable) in milk powder is 28%. Taking into account that 200 ml of milk would give 240 mg of calcium, the bioavailable amount would correspond to 67.2 mg. According to our data, if 100 g of hamburger enriched with CCM at the concentration of 30% IDR leaves bioavailable 52.66 mg (Table 6), one commercial hamburger of 120 g, would leave 63.2 mg calcium, a similar quantity to that reported for milk.

CONCLUSIONS

CCM and CL can be adequate for enriching fresh meat products (hamburgers). They can be added in sufficient amount to give a theoretical calcium level of 30% of RDA. GC crystallizes and it is not recommended for its use. The calcium bioavailability from CCM enriched hamburgers was the highest, close to 15%. This allows that one hamburger of 120 g enriched with CCM 30% RDA, would leave bioavailable 63.2 mg calcium, a similar calcium amount to 200 ml of milk.

Consequently, CCM is proposed as the most adequate salt and the hamburger manufactured with it could be considered as a *source of calcium*, according to the Regulation N° 1907/2006 of the European Parliament.

ACKNOWLEDGMENTS

This work was supported by the projects CONSOLIDER-Ingenio 2010 (Ref. CSD2007-00016), and Group of Investigation BSCH-UCM No. 920276 (Ref. GR35/10A). Thanks to the CAI of Geocronología y Geoquímica Isotópicas (UCM) for technical support in calcium determination.

REFERENCES

- Adluri R.S., Zhan L, Bagchi M., Maulik N. and Maulik G. 2010. Comparative effects of a novel plant-based Ca supplement with two common Ca salts on proliferation and mineralization in human osteoblast cells. *Molec. Cell. Biochem.* 340 (1-2): 73.
- Alonso V., Campo M.M., Provincial L., Roncalés P. and Beltrán J.A. 2010. Effect of protein level in commercial diets on pork meat quality. *Meat Sci.* 85: 7.
- Arihara K. (2006). Strategies for designing novel functional meat products. *Meat Sci.* 74: 219.
- Artés F. and Mínguez M.I. 2002. Analysing changes in fruit pigments. In "Colour in food". B. Douglas (Ed.), p. 248. McDougall Woodhead Publishing Ltd., Cambridge, England.
- AOAC 2011. "Official Methods of Analysis". 18th Ed. Association of Official Analytical Chemists, Washington D.C.
- Belitz H. D., Grosch W., Schieberle P. 2009: Aminoacids, peptides, proteins. In: "Food Chemistry". 4th ed. Belitz H. D., Grosch W., Schieberle P (Ed.). p 8. Springer-Verlag, Berlin, Germany.
- Bourne M.C. 1978. Texture profile analysis. *Food Technol.* 32: 62.
- Cáceres E., García M.L. and Selgas M.D. 2006. Design of a new cooked meat sausage enriched with Ca. *Meat Sci.* 73: 368.
- Cengiz E. and Gokoglu N. 2005. Changes in energy and cholesterol contents of frankfurter-type sausages with fat reduction and fat replacer addition. *Food Chem.* 91(3): 443.
- Charoenkiatkiu S., Kriengsinyos W., Tuntipipat S., Suthutvoravut U. and Weaver C.M. 2008. Ca absorption from commonly consumed vegetables in healthy Thai women. *Health, Nutr. Food* 73(9): 218.
- Cilla A., Lagarda J., Alegría A., Ancos B., Cano M.P., Sánchez-Moreno C., Plaza L. and Barberá R. 2011. Effect of processing and food matrix on Ca and phosphorous bioavailability from milk-based fruit beverages in Caco-2 cells. *Food Res. Int.* 44 (9): 3030.
- Damodaran S. 2008. Aminoacids, peptides and proteins. In: "Food Chemistry". 4th ed. Damodaran S., Parkin K.L. and Fennema P.R. (Ed.) p. 217-230, CRC press. New York.
- Decker E.A. and Park Y. 2010. Healthier meat products as functional food. *Meat Sci.* 86: 49.
- European Parliament 2006. Regulation (EC) N° 1907/2006. Official Journal of the European Union, L396/1-849. 18 December 2006.
- European Parliament 2008. Directive 2008/100/EC. Official Journal of the European Union, L285/9-12. 28 October 2008.
- FDA. 2014. Available in: <http://www.fda.gov/Food/FoodScienceResearch/SafePracticesforFoodProcesses/ucm094192.htm>. Last Updated: 26/11/2014.
- Fernández E., Fernández J., Saya E. and Pérez J.A. 2005. Meat products as functional foods: review. *J. Food Sci.* 70: R37-R43.

- Glahn R.P. and Wortley G.M. 2002. Inhibition of iron uptake by phytic acid, tannic acid and ZnCl₂: Studies using an in vitro digestion/Caco-2 cell model. *J. Agric. Food Chem.* 50(2): 390.
- Gimeno O., Astiasarán I. and Bello J. 1998. A mixture of potassium, magnesium, and Ca chlorides as a partial replacement of sodium chloride in dry fermented sausages. *J. Agric. Food Chem.* 46: 4372.
- Gimeno O., Astiasarán I. and Bello J. 1999. Influence of partial replacement of NaCl with KCl and CaCl₂ on texture and color of dry fermented sausages. *J. Agric. Food Chem.* 47: 873.
- Gonelli S., Campagna M.S., Montagani A., Caffarelli C., Cad-rini A., Giorgi G. and Nuti R. 2007. Ca bioaccessibility from a new Ca-fortified orange beverage, compared with milk, in healthy volunteers. *Int. J. Vit. Nutr. Res.* 77(4): 249.
- Griguelmo N., Abadías M.I. and Martín O. 1999. Characterization of low fat high dietary fiber frankfurters. *Meat Sci.* 52: 247.
- Guéguen L. and Pointillart A. 2000. The bioaccessibility of dietary Ca. *J. Am. Coll Nutr.* 19(2), 119S.
- Ikem A., Nwankwoala A., Oduyungbo S., Nyavor K. and Egiebor N. 2002. Levels of 26 elements in infant formula from USA, UK and Nigeria by microwave digestion and ICP-OES. *Food Chem.* 77(4): 429.
- IOM 2004. Institute of Medicine. Dietary Reference Intakes: Recommended Intakes for Individuals. Department of Agriculture E.E.U.U. Last Updated: 10/2/2014 (available on <http://www.iom.edu/Activities/Nutrition/DRIVitDCA.aspx>).
- ISO 1985. Sensory analysis. Methodology General Guidance (ISO-DP 6658). International Organization for Standardization. Geneva.
- Jiménez-Colmenero F., Reig M. and Toldrá F. 2006. New approaches for the development of functional meat products. In "Advanced technologies for meat processing". L.M.L. Nollet and F. Toldrá (Ed.), p. 275. Boca Raton, E.E.U.U.
- Khan M.I., Arshad M.S., Anjum F.M., Sameen A., Rehman A. and Gill W.T. 2011. Meat as a functional food with special reference to probiotic sausages. *Food Res. Int.* 44: 3125.
- Kim Y. H., Hunt M. C., Mancini R. A., Seyfert M., Lough-in T. M., Kropf D. H., et al. (2006). Mechanism for lactate-color stabilization in injection-enhanced beef. *J. Agric Food Chem.* 54: 7856.
- Korstanje R. and Hoek M. (2001). Ca and other minerals. In "Guide to functional food ingredients" J.Young (Ed.), p. 196. Leatherhead Publishing, Surrey, England.
- Kruger M.C., Gallaher B.W. and Schollum L.M. 2003. Bio-availability of Ca is equivalent from milk fortified with either Ca carbonate or milk Ca in growing male rats. *Nutr. Res.* 23: 1229.
- Lawrie R.A. 1998. The eating quality of meat. In: Lawrie's meat Science. R.A. Lawrie (Ed), p. 212. Woodhead Publishing Ltd, Cambridge, England.
- Lee B., Hendricks D.G. and Cornforth D.P. (1998). Effect of sodium phytate, sodium pyrophosphate and sodium tripolyphosphate on physical-chemical characteristics of re-structure beef. *Meat Sci.* 50 (3): 273.
- Mancini R.A. and Hunt M.C. (2005). Current research in meat color. *Meat Sci.* 71: 100-121.
- Mancini R.A. and Ramanathan R. (2008) Sodium lactate influences myoglobin redox stability in vitro. *Meat Sci.* 78: 529.
- Menéndez-Carreño M., Ansorena D., Milagro F.I., Campión J. and Martínez J.A. 2008. Inhibition of serum cholesterol oxidation by dietary vitamin C and selenium intake in high fat fed rats. *Lipids* 43: 383.
- Morrisey P.A. and Flynn A. 1972. Bioavailability of minerals in milks. In "Milk and milk products in Human Nutrition". S.K. Kon(Ed.). FAO Nutritional Studies.
- Nair M.N., Sumana S.P., Ramanathanb S. Li, R. and Mancini R.A. 2014. Temperature- and pH-dependent effect of lactate on in vitro redox stability of red meat myoglobin. *Meat Sci.* 96: 408.
- Nelson E., Rogers R.R., Frantz J.A. and Ziegler E.E. 1996. Palm Olein in infant formula: absorption of fat and minerals by normal infants. *Am. J. Clin. Nutr.* 64: 291.
- Pakula C. and Stamminger R. 2012. Measuring changes in internal meat colour, colour lightness and colour opacity as predictors of cooking time. *Meat Sci.* 90: 721.
- Pan Z. and Singh R.P. 2001 Physical and thermal properties of ground beef during cooking. *LWT-Food Sci. Technol.* 34: 437.
- Perales S., Barberá R., Lagarda M.J. and Ferré R. 2005. Bioavailability of Ca from milk-based formulas and fruit juices containing milk and cereals estimated by in vitro methods (solubility, dialyzability and interactions with iron and zinc). *J.Agric. Food Chem.* 53: 3721.
- Poulanne E. and Halonen M. 2010. Theoretical aspects of water-holding in meat. *Meat Sci.* 83: 151.
- Prince R, Devine A., Dhaliwal S. and Dick I. 2006. Effects of Ca supplementation on clinical fracture and bone structure. *Arch. Int. Med.* 24(166): 869.
- Recker R.R., Bammi M.S., Barger-Lus M.J. and Heany R.P. 1988. Ca absorbability from milk products, and imitation milk and Ca carbonate. *Am. J.Clin. Nutr.* 47: 93.
- Roberfroid M.B. 2002. Global view on functional foods: European perspectives. *Br. J. Nutr.* 88: S133.
- Saiga A., Tanabe S. and Nishimura T. 2003. Antioxidant activity of peptides obtained from porcine myofibrillar proteins by protease treatment. *J. Agric. Food Chem.* 51: 3661.
- Shiowatana J., Kitthikhun W., Sottima U., Promchan J. and Kunajiraporn K. 2006. Dynamic continuous-flow dialysis method to simulate intestinal digestion for in vitro estimation of mineral bioaccessibility of food. *Talanta* 68: 549.
- Sittikulwitit S., Sirichakwal P., Puwastien P., Chavasit V. and Sungpuag P. 2004. In vitro bioavailability of Ca from chicken bone extract powder and its fortified products. *J. Food Comp. Anal.* 17 (3-4): 321.
- Straub D. 2007. Ca Supplementation in Clinical Practice: a Review of forms, doses and indications. *Nutr. Clin. Prac.* 22: 286.
- Thornberg E. 2005. Effects of heat on meat proteins. Implications on structure and quality of meat products. *Meat Sci.* 70: 493.
- Van der Hee R., Miret S., Slettenaar M., Duchateau S.M.J.G., Rietveld A.G., Wilkinson J.E., Quail P.J., Berry M.J., Dainty J.R., Teucher B. and Fairweather-Tait S.J. 2009. Ca absorption from fortified ice cream formulations compared with Ca absorption from milk. *J. Am. Diet. Ass.*, 109: 830.
- Weiss J., Gibis M. Schuh V. and Salminen H. 2010. Advances in ingredient and processing systems for meat and meat products. *Meat Sci.* 86: 196.
- Zamorano, J. and Gambaruto M. 1997. Contribution to improving the meat water holding capacity test by the filter paper press method. A comparison of three methods for measuring areas. *Meat Sci.* 46: 129.
- Zhang W. Xiao, Samaraweera S., Lee H., E.J. and Ahn, D.U. 2010. Improving functional value of meat products. *Meat Sci.* 86: 15.

4.2. Sodium chloride influence on the technological and sensory properties of hamburgers patties enriched with calcium

Enviado a FleischWirtschaft International

Trabajo experimental

From: Cezanne, Corinna <Corinna.Cezanne@dfv.de>

Date: 2015-10-21 11:20 GMT+02:00

Subject: Automatische Antwort: Manuscript

To: MARIA DOLORES SELGAS CORTECERO <selgar@vet.ucm.es>

Vielen Dank für Ihre Mail.

Ich bin vom 19.10.-30.10.15 nicht im Hause. Ihre Mail wird nicht weitergeleitet. Ich werde Ihre Mail nach meiner Rückkehr beantworten.

Bei dringenden Angelegenheiten bezüglich Ihres Abonnements afz-allgemeine fleischer zeitung, FleischWirtschaft oder FleischWirtschaft International wenden Sie sich bitte an Frau Nicole Seitz E-Mail: nicole.seitz@dfv.de Tel: 069/7595-1974.

Mit freundlichen Grüßen,
Corinna Cezanne
Vertriebswerbung

Fleischwirtschaftliche Fachmedien

Telefon +49 69 7595-1963

Telefax +49 69 7595-1960

corinna.cezanne@dfv.de

<http://www.dfv.de>

dfv-Mediengruppe

Mainzer Landstr.251

60326 Frankfurt am Main

Geschäftsführung: Angela Wisken (Sprecherin)

Peter Esser, Markus Gotta, Peter Kley,

Holger Knapp, Sönke Reimers

Ausichtsrat: Klaus Kottmeier, Andreas Lorch,

Catrin Lorch, Peter Ruß

Registergericht: AG Frankfurt am Main

HRB 8501

SODIUM CHLORIDE INFLUENCE ON THE TECHNOLOGICAL AND SENSORY PROPERTIES OF HAMBURGER PATTIES ENRICHED WITH CALCIUM

Ana M. Soto, M. Luisa García and M. Dolores Selgas*

Code words: calcium salt enrichment, enriched hamburger patties, sodium chloride, technological properties, sensory properties, synergistic action.

ABSTRACT

Calcium enriched hamburgers were manufactured with calcium gluconate (CG), calcium lactate (CL) and calcium citrate-malate (CCM) in sufficient amounts so that 100 g of hamburger patty provided 20% or 30% of the Ca RDA/100g. In order to study if the addition of sodium chloride enhanced their technological and sensory properties, 1.5% NaCl was added. CG30 obtained the worst results and was further discarded. CCM gave the best sensory properties evidencing a synergistic action with NaCl.

Authors' addresses:

Ana M. Soto, Veterinary degree, Prof. Dr. M. Luisa García and Prof. Dr. M. Dolores Selgas*, Dept. Nutrition, Bromatology and Food Technology, Veterinary Faculty, Complutense University of Madrid, Avda. Puerta de Hierro s/n. 28040 Madrid, Spain.

*Corresponding author: Tel: +34 91 3943745; Fax: +34 91 3943743

E-mail: selgar@vet.ucm.es

INTRODUCTION

Over the last years a considerable number of studies have considered several strategies to optimize the presence of specific compounds comprising special and attractive physiological activities, therefore well suited for functional food design. One of the most important strategies entails the incorporation of specific nutrients to food products normally lacking them (GRIGUELMO et al., 1999; CENGIZ and GOKOGLU, 2005; DECKER and PARK, 2010) such as fibre, polyphenols, unsaturated fatty acids, probiotics, minerals, etc. (ARHIARA, 2006; JIMÉNEZ-COLMENERO et al., 2006; GARCIA et al., 2007; DECKER and PARK, 2010; ALONSO et al., 2010; ZHANG et al., 2010; KHAN et al., 2011).

Dietary minerals are essential to carry out various physiological functions having been associated with the prevention of several diseases (DECKER and PARK 2010; ZHANG et al., 2010). Calcium (Ca) is one of the most important owing to its contribution to “bone health” and to the bone and teeth mineralization processes, consequently preventing diseases such as osteoporosis. This mineral also plays other essential physiological roles with respect to cellular function, arterial hypertension, skeletal muscle contraction or blood coagulation (STRAUB, 2007, ADLURI et al., 2010). Thus, health authorities have recommended Ca daily allowances (RDA), i.e., the USA Institute of Medicine (IOM, 2010) has recommended 1.000 mg for adults aged 19-50 while the European Union (Directive 2008/100/EC) recommended 800 mg regardless of age.

Meat and meat derived products are generally recognized as being highly nutritious foods which provide valuable high quality proteins, containing essential amino acids to human health, fatty acids, vitamins (mainly those of the B complex), minerals (mainly iron, manganese, zinc) (OLMEDILLA et al., 2013). Nonetheless, they are characterized by a scarce content of other nutrients such as for example Ca. Previous studies have examined meat product Ca addition, although mainly in the form of calcium salts allowing to replace sodium chloride in view of manufacturing low-sodium meat products (GIMENO et al., 1998, 1999; CHOI et al., 2014). Nevertheless, final Ca contents were not sufficient in order to consider the final meat products as *a source* of this mineral. SOTO et al. (2015) reported on the suitability of Ca as a functional ingredient for fresh meat products having used three calcium salts: Ca gluconate (CG), Ca lactate (CL) and Ca citrate-malate (CCM). These Ca salts have been

food regulated (Regulation EC No 1907/2006) and in addition, they have been described as highly bioavailable (KORSTANJE and HOEK, 2001)

It is well known fact that sodium chloride contributes to a salty taste much appreciated by consumers, however a relationship exists between sodium intake and cardiovascular diseases. In processed meats, NaCl is an unavoidable ingredient added to cured meat products and sausages increasing the hydration and water binding capacity of proteins while improving the texture of the meat products. Moreover, saltiness reduces water activity ensuring preservation and microbial safety. Consequently, salt reduction is equivalent to a shelf-life reduction (KLOOS et al., 2015).

Nonetheless, within of the EU Salt Reduction Framework of 2008 aiming to reduce salt addition by 16% in a period of four years in view of achieving the WHO recommendations of salt intakes of less than 5 g/day, whilst taking into account that in the Mediterranean countries such as Portugal, Spain and Italy the salt intake ranges between 10-11.2 g/day (EU Salt Reduction Framework, 2008), it remains logical that the meat industry has been trying to reformulate conventional products by reducing salt contents simultaneously searching for a compromise between a pleasant saltiness taste and a technological property preservation. In view of the above, the present study has considered the addition of sodium chloride (1.5%) to calcium enriched hamburger meat (SOTO et al, 2015) in order to establish if the NaCl presence favourably modified the technological and sensory properties of the calcium enriches hamburger patties.

MATERIALS AND METHODS

Hamburger manufacturing

Hamburger patties were manufactured according to the methodology described by SOTO et al. (2015) using ground beef meat (Grinder C10, Falsf Co., Spain). Calcium salts (Panreac, Castellar del Vallés, Spain) were added independently to the ground meat in a sufficient amount to give a final Ca content of 20% or 30% of the RDA (1,000mg/day) (IOM, 2010). These calculations took into account the purity of the Ca salts, (>98% based on the anhydrous formula) and the calcium content in each molecule. Hamburger patties were moulded (10 cm diameter, 1 cm height) and kept under refrigeration (2°C) until further analysis after less than 24 h had elapsed.

Trabajo experimental

Two experiments were carried out. Experiment 1 was performed with batches without NaCl and Experiment 2 with batches to which 1.5% NaCl had been added. In each experiment, seven batches were manufactured: a control batch without Ca and 6 batches with calcium gluconate (CG), calcium lactate (CL) or calcium citrate-malate (CCM) added in two concentrations (20 and 30% RDA). Calcium salts and NaCl were homogeneously distributed throughout the ground meat using a mixer (Mainca, Pamplona, España). Batches were named CG20, CG30, CL20, CL30, CCM20 and CCM30 in view of the Ca salt and RDA concentration followed by a 1 or a 2 depending on the experiment in question. Batches were manufactured in triplicate.

Hamburger patties were broiled on an electric grill preheated to 180 °C and cooked for 2 min each side over, allowing for a sufficient time to achieve a temperature of 60 °C inside of the hamburger patty resulting in a good final degree of doneness (Thornberg, 2005). Temperature was controlled using a digital thermometer (TestoMod 735, Barcelona, Spain).

Physico-chemical analysis

Water activity was determined at 22 °C with a Decagon CX1 dew point hygrometer (Decagon Devices, Pullman, WA, USA). The pH was measured with a Crison 2001 pH meter (AOAC, 2011) using a glass electrode. Water-holding capacity (WHC) was tested according to ZAMORANO and GAMBARUTO (1997). The measurements were made in quintuplicate for each batch.

Colour analysis

Colour was measured on the surface of the raw hamburger patties, using a Chroma Meter CR-200 colorimeter (Minolta Co., Osaka, Japan) according to the Space colour CIE $L^*a^*b^*$ system. As illumination source a D-65 was used. L^* , a^* , b^* , Hue angle (tonality) and Saturation index (vivacity) were estimated according to ARTÉS and MÍNGUEZ (2002). The colorimeter was calibrated with a rose tile (L^* 44.88, a^* 25.99, b^* 6.67). For each batch, twenty five measurements were taken at room temperature.

Texture analysis

Textural properties were determined using a Stable Micro System Mod. TA.XT 2i/25 (Surrey, UK) texture analysis instrument. Texture Profile Analyses (TPA) were

Trabajo experimental

performed on the central cores of the cooked hamburger patties batches which were compressed twice to 50% of their original height. A cylindrical probe (5 cm diameter) of aluminium was used for the assay. The following parameters were determined: Hardness (N), Springiness (cm), Cohesiveness (ratio), Adhesiveness (N s), Gumminess (N) and Chewiness (N cm) (BOURNE, 1978). Shear force and work of shearing (N s) were estimated using a Warner-Bratzler blade. With respect to both tests, samples were 1 cm high and had a diameter of 2.5 cm; the crosshead speed was 2 mm/s. All determinations were carried out in quintuplicate.

Sensory analysis

Sensory analyses were performed in individual booths constructed according to ISO DP 6658:2005. The taste panel consisted of forty untrained assessors selected according to their eating habits, acquaintance with the product to be analysed and sensitivity, as well as the reproducibility of their evaluations.

First, an Anchored Descriptive Analysis was performed in both Experiments. The assessors evaluated the similarity between the external appearance of the enriched raw hamburger patties and the control batch. This test was performed under a D-65 illumination source using a 5-point descriptive scale, in which 3 corresponded to the control batch value. Thus, 1 meant *much worse than the reference*; 5, *much better than the reference*; 2 and 4 involved intermediate values. In each experiment, three series were prepared: Control-CG20-CG30; Control-CL20-CL30 and Control-CCM20-CCM30. The series were presented to the panellists with a 30 min difference in order to avoid subjectivities.

A Hedonic Test was performed under a white fluorescent light with the cooked hamburger patties randomly selected. In this case, the panel consisted by 15 trained panellists. The assessors evaluated different attributes (odour, colour, texture, taste and overall acceptability) using a 10 cm non-structured scale (0 = extremely dislike up to 10 = extremely like). Two sessions/day were carried out with an interval of at least 1 h between them in order to avoid panellist fatigue. Unsalted crackers and room-temperature water were provided to clean the palate between samples.

Statistical analysis

Results were statistically analysed by a two-way ANOVA, with factors

represented by the type and the concentration of the Ca salt. Every experiment was analysed separately. Values of $p < 0.05$ were considered to be significant. A Principal Component Analysis (PCA) was performed on the correlation matrix of the colour parameter averages. The results of the PCA were represented as biplots displaying graphically batches and attributes. Statistical analyses were performed using the Statgraphics Centurion XVI.I (Statistical Graphics Corporation, Herndon, VA, USA).

RESULTS AND DISCUSSION

Physico-chemical parameters

The a_w ranged between 0.969 and 0.981 and pH values between 5.7-5.9 with the exception of the CL batches, which showed a pH value close to 5.5. No significant differences were observed between the controls and the Ca added batches. The a_w and the pH values were close to those reported by several authors with respect to raw meats (POULANNE and HALONEN, 2010). WHC differed significantly ($p < 0.05$) between the control hamburger patties manufactured without NaCl (39.0%) and those elaborated with NaCl (45.72%). This is due to the fact that the chloride ion causes a protein electric charge imbalance, promoting protein repulsion and consequently bearing an influence on the WHC (RUUSUNEN and POULANNE, 2005; CHENG and DA-WEN, 2008). The addition of whatever Ca salt supposed no additional WHC change.

Colour analysis

When the colour was determined in the raw hamburger patties, no significant differences were observed regarding the parameters (L^* , b^* and a^*) between batches and their respective controls ($p > 0.05$). However, differences were significant upon comparing hamburger patties manufactured with or without NaCl ($p > 0.05$).

These differences could be well discerned when the results were studied using the PCA represented in a biplot (Fig. 1). A total of 94.5% of the variability was collected by the two principal components: PC 1 accounted for 72.6% of the observed variability whereas PC 2 explained 21.9% of the variation, having been this last PC mainly related to the lightness and redness. The batches were grouped into two clusters which included the batches manufactured without NaCl (white squares) and with NaCl (black circles) is having evidenced the highest values for all of the parameters studied.

Trabajo experimental

The control batches appeared in the centre of the clusters, indicating that their colour was not very different to the colour of the batches manufactured with the calcium salts. It has been reported that the relevance of NaCl with respect to the meat colour changes is related to the pro-oxidant activity which induces myoglobin chemical changes affecting primarily the redness and lightness of the meat products (SØRHEIM et al., 2009). These authors reported that yellowness did not differ significantly, which agrees with our results. The CCM batches were the most similar to the control batches therefore appearing very close to them, positioned in the centre of the biplot (Fig.1). However, the CL batches were sited in the outermost region of each cluster. SEYFERT et al. (2007) reported that the addition of CL to ground beef leads to a low colour stability, probably because it sharply reduces the metamyoglobin level, although this was observed at much higher concentrations than those that have been used in our study. The CG batches appeared in an intermediate position regarding both clusters yet were positioned nearer to the control than to the CL batches.

Similar results were obtained concerning the Hue Angle and the Saturation Index. When the colour of the cooked samples was examined, the values were very similar with respect to all batches due to the brownish compounds derived from the Maillard reaction (data not shown).

Texture analysis

The texture parameters of the cooked hamburger patties were determined. Both experiments evidenced that a higher Ca level corresponded to a greater hardness degree, independently of the type of Ca salt added. Results are displayed in Figure 2. According to THORNBURG (2005) this could be due to the stabilized relationships between Ca and the cooked partially denatured meat proteins, which favours the formation of a more compact network resulting in a hardness increase. The exception were the batches enriched with CG. Calcium gluconate (CG) crystallized in the meat forming visibly small white crystals which appeared homogeneously distributed within of the hamburger patty, especially at the highest concentration (CG30), in which case crystals were larger and more abundant. Crystals interfere with the binding of meat particles and consequently, promote a cohesiveness and hardness decrease. This effect was less pronounced regarding the CG20 batches. For this reason, as well as for the visual appearance (see following section), the CG30 batches were discarded and the CG20 batches were only further studied.

Trabajo experimental

Comparing Experiments 1 and 2 a significantly greater hardness ($p < 0.05$) was observed considering batches prepared with NaCl, even in the case of the control batches (Figure 2). According to DESMOND (2006, 2007) and WEISS et al. (2010), this is due to the NaCl addition, which increases the myofibrillar protein solubilisation. In this way, during the cooking process, these proteins appear in a larger amount on the surface of the minced meat particles, yielding sticky exudates, which gelify during heating and thus modify the texture of the cooked meat products.

Similar considerations could be made for gumminess and chewiness, secondary parameters which depended on hardness, cohesiveness and springiness. The adhesiveness, springiness and cohesiveness parameters did not differ significantly ($p > 0.05$).

The shear test results showed the same TPA tendency and so, the main differences were a Work of Shearing increase related to the amount of Ca added together with NaCl presence (data not shown).

Sensory properties

Figure 3 shows the results of the Anchored Descriptive Analysis. The control batch of Experiment 1 was considered as the reference (3 points). The crystals of the CG batches gave a very different external appearance to that usually expected by consumers, especially concerning the CG30 batches with larger and more numerous crystals. As commented before, these batches were considered inadequate to carry out the sensory analysis. Respective to the CG20 batches the number of crystals was lower and thus the treatment was considered more suitable for inclusion in the test.

The external appearance of all the enriched batches of Experiment 1 scored significantly lower than the reference, with the exception of treatment CL30 which obtained a slightly higher yet not significantly different punctuation. The CG20 treatment obtained the lowest punctuation. On the other hand, the addition of NaCl (Experiment 2) convincingly enhanced the visual appearance of all of the hamburger batches, control as well as enriched batches, in an independent manner of the type and calcium salt quantity. Thus panellists bestowed all batches scores higher than 3 (reference value) ($p < 0.05$) excepting the case of treatment CG20 which obtained a lower score ($p > 0.05$). The CCM batches obtained the highest punctuations. These results

could suggest a synergistic effect between NaCl and CCM since the presence of both salts greatly improved the external appearance.

The Hedonic Test was performed with cooked hamburger patties. The odour, texture and colour were similar among all batches ($p>0.05$) (data not shown), taste having shown the highest differences between both experiments (Figure 4). Concerning Experiment 1, while independent of the type of salt or amount added, Ca influenced the punctuation which was lower compared to the control batch. However, NaCl addition (Experiment 2) enhanced the taste and all batches received similar punctuations ($p<0.05$). Hamburger patties of this experiment achieved significantly higher scores than those of Experiment 1. The highest overall acceptability corresponded to batches of Experiment 2.

These results indicate that taste is the most influential parameter in connection with the sensory quality of the enriched hamburger patties. The presence of any of the three calcium salts used changed the acceptability and panellists described taste as being slightly more acidic. NaCl minimized this perception at the concentrations tested in this study and the panellists considered these hamburgers more acceptable. Our results support the findings of BAUBLITS et al. (2005) and LAWRENCE et al. (2003a, b), who reported that the addition of NaCl prevented off-flavours caused by other salts such as phosphates.

CONCLUSIONS

The NaCl addition (1.5%) enhances the sensory quality of calcium enriched hamburgers patties. Calcium citrate-malate (20-30% RDA) and calcium lactate (20% RDA) are the most adequate calcium salts.

Practical importance

Calcium enriched hamburger patties have been manufactured by the addition of calcium gluconate, lactate and citrate-malate, in sufficient amount to give up to 30% of the RDA. The presence of any of the three calcium salts used changed the acceptability of the product and panellists described taste as being more acidic. The addition of NaCl (1.5%) minimized this perception and the enriched hamburgers were considered more acceptable from a sensory point of view. Consequently, it is recommendable the incorporation of a little NaCl quantity to assure the success of these enriched products

for the consumers.

ACKNOWLEDGMENTS

This work was supported by projects CONSOLIDER-Ingenio 2010 (Ref. CSD2007-00016) of the Spanish Ministry of Education, Culture and Sports Science and the Research Group BSCH-UCM No. 920276 (Ref. GR35/10A).

REFERENCES

1. ADLURI, R.S.L. ZHAN, M. BAGCHI, N. MAULIK, and G.MAULIK (2010): Comparative effects of a novel plant-based Ca supplement with two common Ca salts on proliferation and mineralization in human osteoblast cells. *Molecular and Cellular Biochemistry* 340(1-2), 73-80.
2. ALONSO, V., M.M.CAMPO, L. PROVINCIAL, P. RONCALÉS and J.A. BELTRÁN (2010): Effect of protein level in commercial diets on pork meat quality. *Meat Science* 85, 7-14.
3. ARIHARA K. (2006): Strategies for designing novel functional meat products. *Meat Science* 74, 219.
4. ARTÉS F. And M.I. MÍNGUEZ (2002): Analysing changes in fruit pigments. In "Colour in food". B. Douglas (Ed.), p, 248-282. McDougall Woodhead Publishing Ltd. Cambridge, England.
5. AOAC (2011). *Official Methods of Analysis*. 18th ed. Association of Official Analytical Chemists, Washington D.C.
6. BAUBLITS, R.T., F.W. POHLMAN, A.H. BROWN and Z.B. JOHNSON (2005): Effects of sodium chloride, phosphate type and concentration, and pump rate on beef biceps femoris quality and sensory characteristics. *Meat Science* 70, 205-214.
7. BOURNEM. C. (1978): Texture profile analysis. *Food Technology* 32, 62-66.
8. CENGİZ, E. and N. GOKOĞLU (2005): Changes in energy and cholesterol contents of frankfurter-type sausages with fat reduction and fat replacer addition. *Food Chemistry* 91 (3), 443-447.

9. CHENG, Q. and S. DA-WEM (2008): Factors affecting the water holding capacity of red meat products: a review of recent research advances. *Critical Review of Food Science and Nutrition* 48(2): 137-159.
10. CHOI, Y.M., K.C. JUNG, H.M. JO, K.W. NAM, J.H. CHOE, M.S. RHEE and B.C. KIM (2014): Combined effects of potassium lactate and calcium ascorbate as sodium chloride substitutes on the physicochemical and sensory characteristics of low-sodium frankfurter sausage. *Meat Science* 96, 21-25.
11. DECKER, E.A. and Y. PARK(2010): Healthier meat products as functional food. *MeatScience*86, 49-55.
12. DESMOND, E. (2006): Reducing salt: A challenge for the meat industry. *Meat Science* 74 (1): 188-196.
13. DESMOND, E. (2007): Reducing salt in meat and poultry products. In "Reducing salt foods". D. Kilcast and F. Angus (Ed.),p, 233. Woodhead Publishing Ltd.Cambridge, England.
14. EUROPEAN COMMISSION DIRECTORATE-GENERAL HEALTHAND CONSUMERS (2008): Survey on members states' implementation of the EU salt reduction framework (Web 5 june 2014). http://ec.europa.eu/health/nutrition_physical_activity/docs/salt_report1_en.pdf. 2013
15. EUROPEANPARLIAMENT (2006): Regulation (EC) N° 1907/2006. Official Journal of the European Union, L396/1-849. 18 December 2006.
16. GARCÍA, M.L., E. CÁCERES and M.D.SELGAS (2007). Utilisation of fruit fibres in conventional and reduced-fat cooked-meat sausages. *Journal of the Science of Food and Agriculture* 87, 624-631.
17. GIMENO, O. I. ASTIASARÁN and J. BELLO (1998). A mixture of potassium, magnesium, and Ca chlorides as a partial replacement of sodium chloride in dry fermented sausages. *Journal of Agricultural and Food Chemistry* 46, 4372-4375.
18. GIMENO, O.I. ASTIASARÁN and J. BELLO (1999): Influence of partial replacement of NaCl with KCl and CaCl₂ on texture and color of dry fermented sausages. *Journal of Agricultural and*

Food Chemistry 47, 873-877.

19. GRIGUELMO, N.M.I.ABADÍAS and O. MARTÍN (1999): Characterization of low fat high dietary fiber frankfurters. Meat Science 52, 247-256.

20. INSTITUTE OF MEDICINE (2010): Dietary Reference Intakes for calcium and vitamin D. Department of Agriculture E.E.U.U. Accessed 23/09/2015 (available on <http://www.iom.edu>).

21. ISO-DP 6658:2005. Sensory analysis. Methodology General Guidance . International Organization for Standardization. Genève.

22. JIMÉNEZ-COLMENERO, F., M. REIG and F. TOLDRÁ (2006): New approaches for the development of functional meat products. In "Advanced technologies for meat processing". L.M.L. Nollet and F. Toldrá (Ed.), p. 275. Boca Raton, E.E.U.U.

23. KHAN, M.I., M.S. ARSHAD, F.M. ANJUM, A. SAMEEN, A. REHMAN and W.T. GILL (2011): Meat as a functional food with special reference to probiotic sausages. Food Research International 44, 3125-3133.

24. KLOSS, L., J. DAWN MEYER, L. GRAEVE and W. VETTER (2015): Sodium intake and its reduction by food reformulation in the European Union- a review. NFS Journal 1, 9-19.

25. KORSTANJE, R. and M. HOEK (2001): Ca and other minerals. In: Guide to functional food ingredients (edited by J. Young) Pp. 196-234. Surrey, England: Editorial Leatherhead Publishing.

26. LAWRENCE, T. E., M.E. DIKEMAN, M.C. HUNT, C.L. KASTNER and D.E. JOHNSON (2003)^a: Effects of Ca salts on beef longissimus quality. Meat Science 64 (2), 299-308.

27. LAWRENCE, T. E., M.E. DIKEMAN, M.C. HUNT, C.L. KASTNER and D.E. JOHNSON (2003)^b: Staged injection marination with Ca lactate, phosphate and salt may improve beef water-binding ability and palatability traits. Meat Science 65, 967-972.

28. OLMEDILLA-ALONSO, B., F. JIMÉNEZ-COLMENERO and J. SÁNCHEZ-MUNIZ (2013): Development and assessment of healthy properties of meat and meat products designed as functional foods. *Meat Science* 95, 919–930
29. POULANNE, E. And M. HALONEN (2010): Theoretical aspects of water-holding in meat. *Meat Science* 83, 151-165.
30. RUUSUNEN, M. and E. POULANNE (2005): Reducing sodium intake from meat products. *Meat Science*, 70(3), 531-541.
31. SEYFERT M., M.C. HUNT, M. LUNDESJÖ AHNSTRÖM and D.E. JOHNSON (2007): Efficacy of lactic acid salts and sodium acetate on ground beef colour stability and metmyoglobin-reducing activity. *Meat Science* 75, 135-142.
32. SOTO, A.M., M.L. GARCÍA and M.D. SELGAS (2015): Technological and sensory properties of hamburgers enriched with calcium. Study of the *in vitro* bioavailability. *Italian Journal of Food Sciences* 27, 1-9.
33. SØRHEIM, O., F. WESTAD, H. LARSEN and O. ALVEIKE (2009): Colour of ground beef as influenced by raw materials, addition of sodium chloride and low oxygen packaging. *Meat Science* 81, 467-473.
34. STRAUB, D. (2007): Ca Supplementation in Clinical Practice: a Review of forms, doses and indications. *Nutrition in clinical practice* 22, 286-296.
35. THORNBERG, E. (2005): Effects of heat on meat proteins. Implications on structure and quality of meat products. *Meat Science* 70, 493-508.
36. WEISS, J. M. GIBIS, V. SCHUH and H. SALMINEN (2010): Advances in ingredient and processing systems for meat and meat products. *Meat Science* 86, 196-213.
37. WORLD HEALTH ORGANIZATION REGIONAL OFFICE FOR EUROPE, Mapping salt reduction initiatives in the WHO European Region (Web 10 may 2014) http://www.euro.who.int/__data/assets/pdf_file/0009/186462/Mapping-salt-reduction-initiatives-in-the-WHO-an-Region.pdf. 2013.
38. ZAMORANO, J. and M. GAMBARUTO (1997): Contribution to improving the meat waterholding capacity test by the filter paper press method. A comparison of three methods for measuring areas. *Meat Science* 46, 129-137.

Trabajo experimental

39. ZHANG, W., S. XIAO, H. SAMARAWEEERA, E.J. LEE and D.U. AHN (2010):
Improving functional value of meat products. Meat Science 86, 15-31.

Figure 1: Principal Component Analysis: Description of the main variations in colour of experimental hamburger patties. White squares: without NaCl. Black circles: with NaCl.

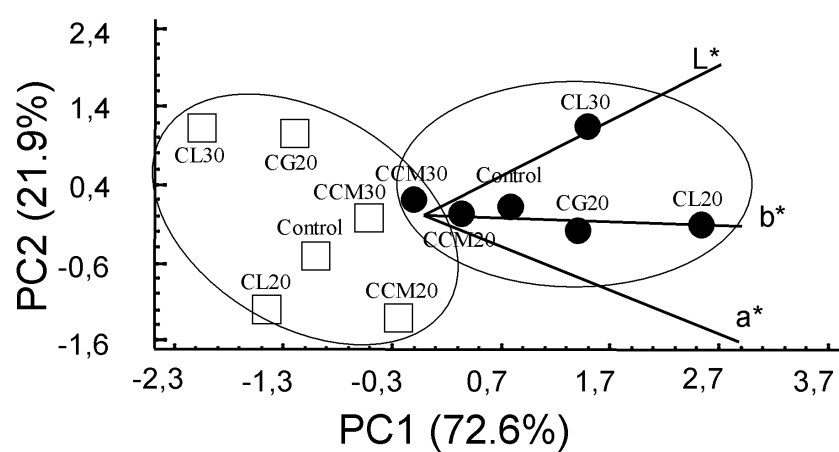


Figure 2: Hardness values determined in the Texture Profile Analysis performed with the experimental hamburger patties. Experiment 1: without NaCl (□). Experiment 2: with NaCl (■).

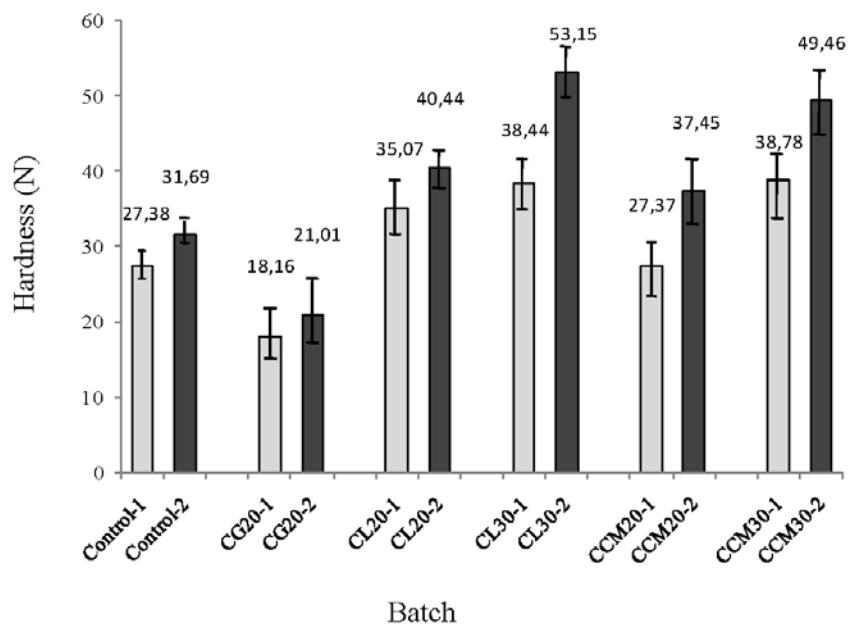


Figure 3: External appearance evaluated in the Anchored Descriptive Analysis. The experimental hamburger patties were compared with a conventional hamburger (Control-1) as reference.

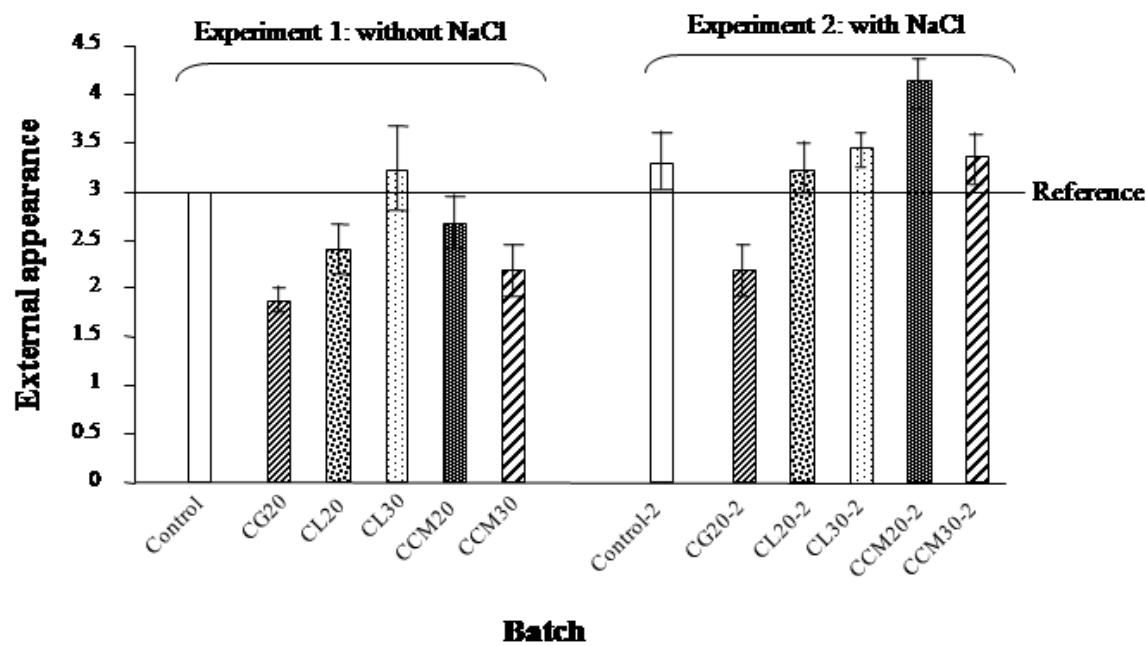
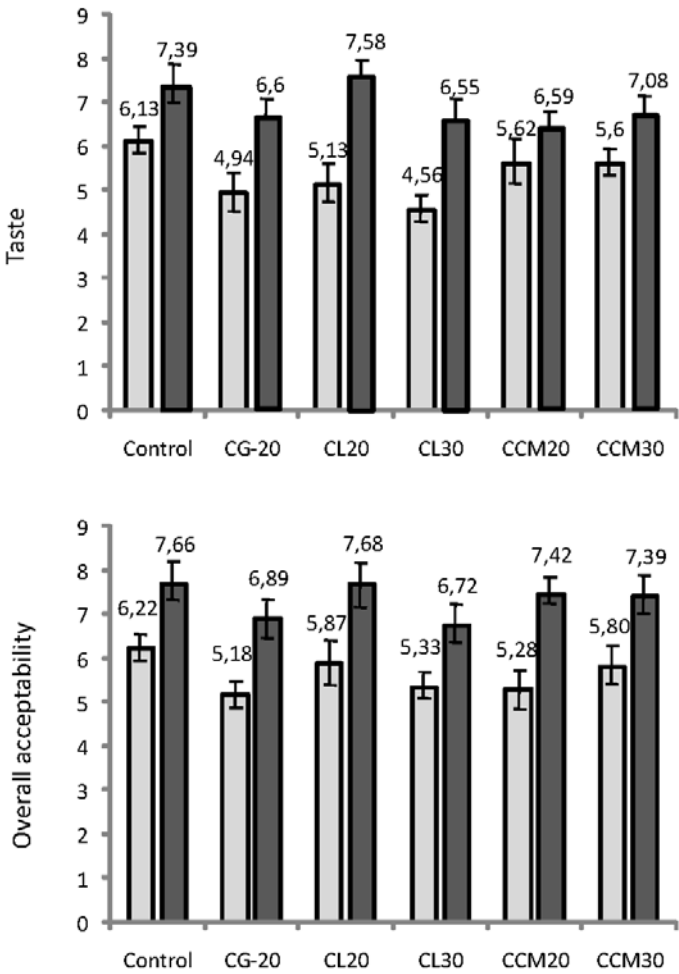


Figure 4: Hedonic Test: Taste and Overall acceptability evaluated in the experimental hamburger patties. Experiment 1: without NaCl (□). Experiment 2: with NaCl (■).



4.3. Calcium bioaccessibility and technological properties of enriched cooked sausages

Enviado a Journal of Food Science and Technology

From: **Journal of Food Science and Technology** <em@editorialmanager.com>
Date: 2015-10-08 14:44 GMT+02:00
Subject: JFST: A manuscript number has been assigned to Calcium bioaccessibility and technological properties of enriched cooked sausages
To: Maria Dolores Selgas <selgar@vet.ucm.es>

Dear Dr Selgas,

Your submission entitled "Calcium bioaccessibility and technological properties of enriched cooked sausages" has been assigned the following manuscript number: JFST-D-15-01793.

You will be able to check on the progress of your paper by logging on to Editorial Manager as an author.
The URL is <http://jfst.edmgr.com/>.

Thank you for submitting your work to this journal.

Kind regards,

Editorial Office
Journal of Food Science and Technology

Calcium bioaccessibility and technological properties of enriched cooked sausages

Ana María Soto · María Luisa García · María Dolores Selgas

A.M. Soto

Veterinary Faculty, Nutrición Bromatología y Tecnología de los Alimentos Department.

Complutense University, Avda. Puerta de Hierro s/n. 28040. Madrid.

e-mail: ana.soto@ucm.es

M.L. García

Veterinary Faculty, Nutrición Bromatología y Tecnología de los Alimentos Department.

Complutense University, Avda. Puerta de Hierro s/n. 28040. Madrid.

e-mail: mlgarci@ucm.es

M.D. Selgas (*Corresponding author*)

Veterinary Faculty, Nutrición Bromatología y Tecnología de los Alimentos Department.

Complutense University, Avda. Puerta de Hierro s/n. 28040. Madrid.

e-mail: selgar@ucm.es

Calcium bioaccessibility and technological properties of enriched cooked sausages

Abstract

Cooked meat products have been enriched with different calcium salts (calcium gluconate, lactate and citrate malate) at concentrations to provide 20, 30 and 40% of the RDA/100g product. *In vitro* calcium bioaccessibility and technological plus sensory properties were studied. Similar technological properties with no remarkable differences were observed. The incorporation of calcium gluconate entailed the lowest overall acceptability at the concentration of 40% RDA, which compromises its use in these meat product types having been further excluded. Batches manufactured with calcium lactate or citrate malate at the higher concentrations (40% RDA) showed bioaccessibility percentages close to 10%. These results seem to be more related to food matrix attributes than to the type of salt applied. This implies that a complex protein network was established within of these meat products which difficult calcium liberation. In consequence, both salt types were found to be suited for calcium enrichment of cooked meat products.

Key words: Calcium, *in vitro* bioaccessibility, meat products, enriched products

Introduction

Numerous essential nutrients are required for the correct functioning of the human organism. Among these, calcium holds important roles with regard to several physiological activities, mainly taking part in the endochondral ossification process, with demonstrated strong links between an insufficient calcium uptake and diseases such as rickets in children, osteoporosis in the elderly or also in relation to the cellular function maintenance connected to arterial hypertension (Guéguen and Pointillart 2000; Peacock 2010; Schulz et al. 2004; Adluri et al. 2010; Moseley and Jan de Beur 2010). Moreover, dietary calcium binds to the heme iron thus suppressing hemoprotein activity while promoting colon carcinogenesis via the N-nitrosation or the fat peroxidation (Corpet 2011; Toldrá and Reig 2011). For that reason, several health organizations worldwide recommend a daily calcium intake (RDA) of 1,000 mg for people aged 19-50 years (Institute of Medicine 2010) or of at least 800 mg/per day for adults of any age (Directive 2008/100/EC).

It is widely accepted that dairy products are the primary source of calcium in Western countries (close to 75%), at the same time as milk calcium bioaccessibility has been described to be higher compared to other sources of this mineral (Guéguen and Pointillart 2000; Van der Heer et al. 2009). Nevertheless, the population increase with absorption problems such as lactose non-persistence or allergies (Weaver 1998) supports the importance of food enrichment as a reliable vehicle to deliver this essential mineral.

Different ways for calcium food enrichment have been described, such as the addition of liquid or powdered milk (Moreiras et al. 2003; Sittikulwitit et al. 2004), inclusive egg shells as a source of calcium (Daengpork et al. 2002), nevertheless, the most common strategy comprises the addition of calcium salts, which according to Weaver (1998) should be inexpensive, safe and should also have a good bioaccessibility. Along these lines, numerous salts have been tested, for instance, calcium phosphate and citrate (Mekmene et al. (2009), carbonate (Van der Heer et al. 2009), chloride (Costa et al. (2008), lactate (Daengpork et al. 2002; Salazar et al. 2009), gluconate (Martín-Diana et al. 2007) or calcium citrate-malate (Soto et al. 2012).

Meat is by and large considered one of the most nutritious foods in view of the high protein content composed of several essential amino acids with relevant nutritional values; nonetheless, it is characterized as a rather poor source of calcium. Meat product calcium enrichment has been considered an excellent opportunity to improve the

functional effects of processed meat products (Allender et al. 1996; Appel et al. 1997; Margolis et al. 2008). It remains also very important to evaluate the nutritional final value of the product which implies to establish if bioactive compounds are available to be absorbed from food (Neilson and Ferruzi, 2013). *In vitro* methods are currently being used to assess bioaccessibility and they are considered to be a good alternative compared to the *in vivo* procedures as their results constitute a fair approximation to what really happens during the *in vivo* mineral absorption course of action (Perales et al. 2005; Fernández-García et al. 2009).

In consequence, the objective of this study has been to manufacture meat products, concretely cooked meat products enriched with calcium and to study the calcium as well as the technological and sensory properties of the sausages obtained.

For that purpose, calcium gluconate, calcium lactate and calcium citrate-malate have been selected all characterized by their high bioavailability, close to a 30% (Korstanje and Hoek 2001). The Regulation No. 1907/2006 of the European Union allows for their incorporation as calcium sources into food products. The calcium salts were added in sufficient amounts to provide 20, 30 or 40% of the RDA/100 g of product (Institute of Medicine, 2010). These high amounts were selected looking for a compromise between the maxima concentration of calcium and the best technological and sensory qualities on the experimental sausages.

Material and methods

Sausage processing and fabrication

Sausages were manufactured according to a traditional *mortadella* formula, a Spanish bologna-type cooked meat product: 55% pork meat, 30% pork fat (back), 10% ice and 5% of a commercial mixture of spices and additives (Curavi®, Anvisa, Arganda del Rey, Madrid, Spain), made up of salt, dextrose, soy proteins, spices, glutamic acid, emulsifiers, gelling agents, antioxidants, potassium nitrite, trisodium citrate and carminic acid used as a colourant. The lean meat and the back pork fat were obtained from a local market. The cooked meat products were manufactured at the Pilot Plant of our Department.

Calcium lactate (CL) and calcium gluconate (CG) were provided by Panreac (Castellar del Vallés, Spain) while calcium citrate-malate (CCM) by the Jost Chemical Company (St. Louise, Mo., USA) comprising all chemicals a purity >98% based on the anhydrous substances. The respective salts were added in sufficient amounts to yield 20, 30 or 40% of the RDA/100 g of product.

Ten batches were manufactured (each of 2.5 kg). One batch was manufactured without calcium salts (control batch), three batches were enriched with every calcium lactate (CL) amounts (20, 30 and 40%); in the same way, other three batches were added with calcium gluconate (CG) (20, 30 and 40%) and the remaining three batches, with calcium citrate-malate (CCM) (20, 30 and 40%). Quantities added were calculated according to the molecular weight and to the calcium content of the molecules (Table 1). The calcium salts were added to the mixture with the spices. All these batches were manufactured in duplicate, in two different manufactures, yielding a total of 20 batches.

Meat was chopped in a bowl (Robot-Coupe Inc. Mod 20 v, MS, USA) during 2 min; one half of the spices/calcium salt mixture together with ice were added and chopping proceeded during other 2 min, after which the remaining ice and commercial spices and additives/calcium salt mixture were added and the blend was mixed until the meat emulsion was completed. Temperature did not exceed 4°C. The mixture was stuffed in artificial casings (8 cm diameter) (Fibran-Pack®, Girona, Spain), previously rehydrated with water and clipped at both ends (Polyclip System, Niedecker, Germany). Sausages were cooked in a steam oven at 78°C/30 min. The internal temperature (72°C) was measured with an Interface EBI- AE 2000 (Ebro Electronic GmbH and Co., Ingolstadt, Germany). Finally, sausages were cooled in ice water and stored at 4°C.

Physico-chemical analysis

The water activity (a_w) was determined with a Decagon CX1 dew point hygrometer (Decagon Devices, Pullman, WA, USA) at 23°C. The pH was measured with a Crison 2001 pH-meter (Hach Lange Spain, Barcelona, Spain). Water holding capacity (WHC) was determined using 0.3 g of each sample and pressed within two metacrilate sheets during 5 minutes (Zamorano and Gambaruto, 1997). Dry matter and ashes were determined according to the AOAC procedures (2011). Five determinations were performed on every batch.

Colour

Colour was measured with a Chroma Meter CR-400 colorimeter (Minolta Co. Osaka, Japan) using the colour Space CIEL*a*b*. The colorimeter was calibrated by means of a rose tile (L* 44,88; a* 25,99; b* 6,67) and a D-65 illuminant source (MacDougall 2002). The determined parameters were L*, a*, b*, Hue Angle (tonality) and the Saturation Index (Chroma) according to MacDougall (2002). Samples were sliced to a thickness of 3 mm. Measurements were performed on five slices for each batch, at room temperature and just after having carried out cuts to prevent any colour degradation (Pérez-Álvarez et al. 1999). Twenty measurements (4 fold /slice) for each batch were performed. To examine and to relate the actual colour difference values (ΔE) to the visually perceived differences, Euclidean relations were determined (Savadkoobi et al. 2014):

$$\Delta E = (\Delta L^{*2} + \Delta a^{*2} + \Delta b^{*2})^{1/2}$$

with ΔE being equal to the square root of the sum of squared differences among the L*, a* and b* coordinates of calcium added samples and the control without calcium salts. The equation represents the comprehensive variation contributions of the three colour parameters.

Texture analysis

The Stable Micro System Mod. TA.XT 2i/25 texturometer was used to evaluate the textural properties of the batches. Two analyses were carried out: a Textural Profile Analysis (TPA) and a Shearing Test (Bourne 1978). The crosshead speed of both tests involved 2 mm/s.

The TPA was performed using the central cores (1 cm high and 2.5 cm diameter) of eight slices of each batch which were compressed twice to 50% of their original height. The following parameters were determined: Hardness (N), Adhesiveness (N s), Springiness (cm), Cohesiveness (ratio), Gumminess (N) and Chewiness (N cm).

The Shearing Test was executed with a Warner-Bratzler HDP/BS blade working by the knife-edge. Shear force (N) and the Work of shearing (N s) were measured. The samples were other eight cores (1 cm high and 2.5 cm diameter) belonging to each sausage.

Sensory analysis

A Hedonic Test was carried out using a non-structured 10 cm scale (0=dislike extremely and 10=like extremely) to rate odour, colour, taste, texture as well as overall acceptability. Forty untrained assessors were selected according to their habits, acquaintance with the sausages to be analyzed, their sensitivity together with the ability to reproduce accurately the evaluation of the samples. The analysis was performed in individual booths constructed according to the specifications of the International Organization for Standardization (ISO-DP6658) (1985) under white fluorescent lights. Two slices of each sample (2 mm high approximately) were served to the assessors. Unsalted crackers and water at room temperature were also provided to rinse the palate between samples.

The twenty batches of the two manufactures were randomly distributed in six different series of three batches each one and one series with the two remainder ones. The series was served to the panellist in seven tasting session.

A Preferential Test was also performed in which the assessors were asked to rank the coded samples according to the degree of liking or disliking. Three series were performed. Each series had the three batches manufactured with the different concentrations (20, 30 and 40%) of each calcium salt. In every session one series was analyzed and the sample ranked first was given the highest punctuation (3 points) while the other samples were assigned 2 and 1 points respectively. This test needed fluorescent lights to be performed.

In both Hedonic and Preferential Test, the appraisals were carried out at least 1 hour apart in order to avoid the assessor's fatigue.

Calcium determination

Calcium determination was performed in the Geochemistry Center of the Complutense University of Madrid (Spain) according to the methodology described by Ikem et al. (2002). Firstly, 5 g of every batch were defatted with a mixture of chloroform:methanol (1:1) according to the methodology of Hanson and Olley (1963). Then, samples were freeze-dried and kept under refrigeration until their analysis was carried out with inductively coupled plasma-optical emission spectrometry (ICP-OES).

For microwave digestion, 1.0 g of each defatted sample was subjected to an acid digestion with 6 ml of HNO₃ and 2 ml of H₂O₂ (Suprapure, Merck) in a microwave digestion system and diluted to 10 ml with deionized water (Milli-Q Millipore, Merck KGaA, Darmstadt, Alemania). Blank digestion was carried out in the same way. Digestion conditions for the microwave system consisted of the following: 2 min-250 W, 2 min-0 W, 6 min- 250 W, 5 min- 400 W and 8 min-550 W. A Perkin Elmer DV 3300 ICP-OES was used to analyze the Ca level of the digested samples. Bovine muscle BCR No 184 (Sigma-Aldrich, Sant-Louis, MO, USA) was used as a reference. The experimental values obtained were in the range of the certificate value with their corresponding uncertainties. All determinations were carried out in duplicate.

Bioaccessibility

Calcium bioaccessibility was studied by means of a static *in vitro* method performed according to Shiowatana et al. (2006). All enzymes were purchased from Sigma-Aldrich (St Louis, MO, USA) while all other reactives were supplied by Panreac (Barcelona, Spain). Samples (10 g) of *mortadella* were homogenized (Polytron® SEV-geprüft., Luzerne, Switzerland) with 50 ml of 0.2 M phosphate buffer. The pH was adjusted to 2.0 with 5 N HCl. To simulate the gastric phase, 0.33 ml of pepsin suspension [0.16 g pepsin (EC 232-629-3)/ 1 ml 0.1 N HCl] were added. Samples were incubated in a shaker (130 rpm) at 37 °C during 2 h (Thermo Scientific MaxQ4000, Iowa, USA).

To simulate the intestinal phase, 20 g of the gastric digest were mixed with 5 ml of pancreatin-bile conjugate, [0.2 g pancreatin from porcine pancreas (EC 232-468-9)] and 1.25 g of porcine bile extract (EC 232-369-0) in 50 ml 1 M NaHCO₃. The pH was adjusted to 7-7.5 using 2 M NaHCO₃ and the total volume of the digest was measured. Other 20g aliquots of the gastric digest were placed in contact with a cellulose dialysis tube (25 mm diameter) (Sigma Aldrich) using a molecular weight cut-off of 12-14 kDa. Distilled water (25 ml) and the same volume of 2 M NaHCO₃ determined before were placed inside of the tube. The flask with the aliquot of the gastric digest and the dialysis tube was incubated at 37 °C in a shaker (at 130 rpm) until the pH reached a value of 5. Finally, 5 ml of the pancreatin-bile conjugate were added to the gastric phase where the dialysis tube was located and incubation proceeded during another 2 h at 37 °C.

After completing the dialysis process, the dialyzed Ca (inside of the dialysis tube) and the non-dialyzed Ca (outside of the dialysis tube) amounts were determined.

The last one of the two, besides of the Ca contained in the solid residue (solid delivery), corresponds to the Ca which would be eliminated.

Bioaccessibility was estimated as follows:

$$\text{Bioaccessibility (\%)} = [\text{Dialyzed Ca (mg)} / \text{Ca sample (mg)}] * 100$$

Statistical analysis

The effect of the calcium salt types and levels was studied by means of a two-way ANOVA. This study determined the differences between the batches due to the type and to the quantity of the calcium salts added.

The preferential test was undertaken according to the procedure of multiple comparisons established by Newell and MacFarlane (1987).

Principal component analysis (PCA) (Arvanitoyannis and Houwelingen-Koukaliaroglou 2003) was performed with regard to the correlation matrices of the texture and the sensory parameters. The analysis was carried out using a combined dataset encompassing the average texture properties or the sensory responses of the sausages enriched with the different salts assayed. Results were represented as bi-plots in which both the batches (PC-scores) and attributes (PC-loadings) were plotted. The statistical package Statgraphics 5.0 Plus for Windows (Statistical Graphics Corporation, Herndon, VA, USA) was used.

Results and discussion

Physico-chemical analysis

Dry matter content as well as the water activity (a_w) showed similar values with regard to all the batches ($p>0.05$) and independently of the type and of the amount of calcium salt added, displaying mean values of 56.20 ± 2.42 and 0.962 ± 0.006 , respectively. Nonetheless, the water holding capacity (WHC) and the pH were affected by the type of calcium salt added (Table 2). In this manner, the control and the CL enriched batches evidenced similar values ($p>0.05$), while the CG or the CCM batches showed significantly lower pH values. Similar WHC values were observed among all batches ($p>0.05$) and agree with the data reported by Daengpork et al. (2002). Cofrades et al.

(2006) reported while keeping the meat protein content constant that increasing ingredients in cooked meat functional products did not significantly alter the pH values.

The ashes content (data non shown) increased significantly according to the amount of calcium salt added, from a mean value of 2.72 ± 0.32 of the control batch up to a mean value of 2.87 ± 0.48 of the batches enriched with the highest calcium salt level (40% RDA). Other authors (Ayo et al. 2008) have reported similar data in relation to cooked meat products enriched with different amounts of powdered walnuts added as a functional ingredient or also for instance Tobin et al. (2013) with regard to cooked-meat products enhanced with different fat and salt percentages.

Colour properties

Colour constitutes a very important attribute to consumers as it entails the first information perceived when they buy a processed meat product. Table 3 shows the results obtained.

The lightness (L^*) parameter of the control batch showed the lowest value and differed from the batches with calcium added. The differences detected could be related with the interaction of the powdered salt particles with light. In this sense, Joshi and Brimelow (2002) had already described that with finer particles scattered in food, more incident light is reflected which affects food rendering a lighter appearance. Similar results were also described by Viuda et al. (2010) using *mortadella* supplemented with citrus fibre. These last authors reported that the added molecules could facilitate the presence of spaces between components and thus, more light was reflected than in the control. Our results agree with these authors implying that the amounts of the calcium salt added were sufficiently high as to favour a major light reflection.

Redness (a^*) values were, in general terms, similar among all batches, with the exception of the CG30 and CG40 batches which showed lower values. The slices of these batches displayed visible small white crystals homogeneously distributed within the batter. These were the consequence of the CG crystallization which occurs when the meat batter contacts with water or due to the amount of this salt it had to be added to achieve the desired concentration. In either case, the result was an influence on the redness colour measurements. Crystal presence was especially visible at the maximum concentrations (CG40) as pieces were larger and more numerous. These crystals influenced negatively on the appearance of the slices and shed a different aspect to that

which consumers usually expect. The viability of this salt could seriously be compromised at the higher concentrations assayed. Batches enriched with the CG20 also contained crystals, yet they were smaller and could only be detected as little white dots.

Yellowness (b^*) behaved in a different way in relation to the type of salt used. It could be noted that the CG and CL batches had a tendency to increase yellowing according to the salt amount added, while the CCM batches showed similar values to the control. Daengpork et al. (2002) manufactured 'Nahms' sausages fortified with either commercial or hen eggshell derived calcium lactate, and no significant differences were observed with regard to the L^* a^* or b^* parameters although noticing a slightly increase in yellowness. However, Moreno et al. (2011) observed similar b^* values in restructured fish products enriched with calcium caseinate, lactate or chloride at concentrations of 0.1-1%. Horita et al. (2011) added calcium chloride (0.5%) as a NaCl substitute and they did not observe differences among any of the colour parameters. This disparity in results can be related to the amount of calcium salt added, because in our experiments it was included higher amounts (see Table 1) than those used by the mentioned authors.

The Hue Angle increased with the addition of the calcium salts (in relation to the control batch), while the Saturation Index was similar among all batches with the exception of CG batches which showed lower values ($p>0.05$).

The ΔE parameter ranged between 2.41 ± 0.16 to 4.79 ± 0.10 . According to Savadkoobi et al. (2014), the colour modifications measured instrumentally can be considered as noticeable visual changes when the total colour difference values are higher than 2. Consequently, the results obtained in the present study indicate differences between the control and the calcium enriched batches.

Texture analysis

Table 4 shows the results obtained with regard to the texture analysis. In general terms, the texture parameters rendered very similar results. In the case of hardness, the control batch was slightly harder than the enriched batches, although no significant differences were detected. The main differences were observed in the adhesiveness, corresponding the lower value to the control which differed significantly from the adhesiveness displayed by the enriched batches ($p<0.05$). Although springiness and cohesiveness

evidenced similar values with regard to all batches, the CG batches showed the highest springiness while the CL batches presented the highest cohesiveness.

Cooked sausages have the structure of a gel in which, the denaturation of the proteins cause the formation of a three-dimensional network that yield the meat gel. It already has been described that calcium ions establish bonds between proteins which favour the formation of a stronger network in which syneresis is possible (Damodaran, 2008). With the syneresis, some exudates are produced which can increase the adhesiveness. Therefore, the values in the control batch (without calcium) are lower than the enriched batches.

In relation to gumminess and chewiness, it was noted that the CL enriched batches accounted for the highest degree of gumminess while the CG batches represented the highest level of chewiness, nonetheless differences were not significant.

Pérez-Mateo and Montero, (2002) reported that calcium contribute in a large proportion to the textural changes occurring during gelling of minced fish, yielding a higher springiness. However, in our work this relationship has not been observed. The calcium salt batches were similar to the control batches and inclusive it was possible to observe a decreasing hardness tendency.

The study of the Shear properties (data not shown) revealed scarce differences between batches; in this manner, the control's Shear force amounted to 69.51 ± 4.10 N and as regards the enriched batches ranged between 64.91 ± 3.54 N of CG30 to 73.33 ± 2.30 N of CL20. These correspondences were also observed in connection with the Work of shearing.

In general terms, these results agree with those that have been described by Daengpork et al. (2002) possibly indicating that these texture properties do not change, independently of the type of salt used and at the concentrations assayed in this study.

Texture data was also analyzed using covariance PCA, comprising a matrix of average values. Figure 1 displays a projection of the TPA data relating to the first two principal components. PC1 represented 39.37% while PC2 comprised 31.55% of the explained variation, both accounting for 70.92% of the total variability observed. PC1 was characterized by springiness, adhesiveness and hardness running in an opposite way to cohesiveness; while adhesiveness consisted of the most important parameter as it was represented by the longest vector. PC2 displayed mainly springiness and cohesiveness positioned in opposite directions.

Three clusters could be appreciated corresponding to the three calcium salts

assayed. The control batch was included within of the CCM cluster. These results seem to indicate that despite of the low variability detected slight differences could be appreciated between batches in relation to the type of salt more than to the quantities added, with salt CCM having exhibited the most similar results to those of the control batch.

Sensory properties

In general terms, all batches yielded similar sensory values quantified by the Hedonic test (Table 5) reaching punctuations higher than 5, with the exception of batch CG40 which showed the lowest overall acceptability. This outcome could have been due to the possible effect caused by the small white crystals which modified the external appearance of the meat product. The remaining batches were all well accepted by the panellists who indicated that they would be suitable for consumption and marketing. No significant differences were observed with regard to odour, texture or colour. Nevertheless, significant differences in relation to taste could be appreciated, mainly with reference to the CL40 and CG40 batches which achieved the lowest punctuations ($p<0.05$).

Figure 2 depicts the configuration of the samples in relation to the sensory properties. Only four basic sensory parameters were studied: odour, colour, texture and taste. PC1 collected 65.66% of the variability and was represented mainly by the texture and the taste. PCA2 accounted for 20.20% and was mainly related to odour and colour. Both principal components accumulated together for 85.86% of the total variability. Batch distribution established again three clusters representing each of the different salt types although CG20 was clustered together with the CCM and the control batches. Batches enriched with 40% RDA always appeared most distant from the control batch, namely towards the left of each cluster. This fact seems to indicate that this level could possibly compromise the salt viability as a functional ingredient of cooked meat products, other than the overall acceptability was highly ranked with the exception of the batch CG40 that achieve the lowest punctuation with significant differences in relation to the CG20 and CG30 batches (Table 5).

In reference to the Preferential Test, samples were ordered from the most to the least valued by assessors. No significant differences ($p>0.05$) were detected between the enriched batches (data not shown). As in the Hedonic Test, the highest concentration of

CG obtained the lowest punctuation; thus, this salt at the maximum concentration should be avoided as a calcium source added to this type of meat product.

This behaviour has also been previously described by Totosa et al. (2004) who performed a partial replacement of sodium chloride by CaCl in emulsified meat products and found no sensory differences in relation to the control batch. Similar results were also obtained by Horita et al. (2011) who added calcium chloride as a NaCl substitute in bologna type sausages. Daengpork et al. (2002) assayed several amounts of calcium lactate in pork sausages arriving to the conclusion that the most adequate lactate level consisted of 159 mg/100 g product. It is important to be in mind that these authors have used calcium concentration lower than those that have been applied in the present study.

Bioaccessibility

Results obtained in the *in vitro* calcium bioaccessibility study are reflected in Table 6. The batches CG were discarded due to their technological and sensory characteristics considering only batches with CCM and CL for this study. In order to facilitate the calcium analysis, it was decided to perform the bioaccessibility analysis using the batches manufactured with the higher concentration: CL40 and CCM40.

Calcium content of the cooked sausages was slightly higher than that expected: 473.06 ± 24.49 mg/100 g of batch CL40 and 436.85 ± 26.22 mg/100 g of the CCM40 batch, respectively 18% and a 10% more than anticipated. More than the 90% of the calcium detected in the sausage was identified in the gastric phase, amounting to 90.40% in the case of CL40 and 90.85% with respect to CCM40. Nonetheless, following the intestinal phase the amount of calcium detected was much lower. The uncovered dialyzed calcium of batch CL40 was 47.92 ± 0.51 mg while the non-dialyzed calcium was equal to 88.66 ± 5.27 mg; therefore the solid delivery calculation yielded 291.96 mg. Accordingly for CCM40, the respective values were 35.95 ± 0.40 mg, 79.96 ± 4.87 mg and 280.97 mg for the solid delivery (Table 6).

The percentage of calcium bioaccessibility consisted of a relation between the calcium dialyzed opposed to the calcium content present in 100 g of the original product. Upon applying the bioaccessibility formula (see Material and Methods) CL batches provided 9.94% and CCM batches rendered 8.23% ($p > 0.05$).

The calcium absorption percentages determined in the CCM and CL batches were

relatively low in comparison to the Ca absorption rates which have been described in the case of milk and milk derived products. In relation to these food types, Heany et al. (1988) and Van der Heer et al. (2009) reported mean values of 27.6% for milk and between 15 – 44% for milk derived products such as ice-cream. Nelson et al. (1996) determined a percentage of 39% in an infantile milk formula. However, other authors have reported lower Ca bioaccessibility rates such as for instance Mesías et al. (2009) who estimated 10-15 % of soluble calcium analyzing two different teenager designed diets or such as Frontela et al. (2009) who reported Ca bioaccessibility degrees between 0.66 - 13%. Other authors have determined a Ca absorption level up to 29% in enriched orange juices (Gonelli et al. 2007). In line with the above, Cilla et al. (2011) reported Ca efficiency uptake values ranging 10.47-19.82% pertaining to different milk-based fruit beverages while Perales et al. (2005) established calcium bioaccessibility to span 5.0-31% in the case of infant and adapted milks.

It has been well established that many factors exist which influence calcium absorption, as for example interferences with other food components. In view of this, Dendougui and Schewedt (2004) reported that Ca bioaccessibility would not exceed 10% of all of the product's calcium due to the presence of fibre and also in function of the product's pH. Van de Heer et al. (2009) concluded that the factors which influence calcium absorption could change. Along these lines other authors have suggested that the fat level and concretely some fatty acids (i.e. stearic acid) could reduce calcium absorption (Haderslev et al. 2000; Cilla et al. 2011) So, free long-chain fatty acids form salts with divalent cations yielding indigestible calcium soaps which are not well absorbed in the gastrointestinal tract (Van der Hee et al. 2009). Abrams (2010) reported that not only the calcium source or the dietary factors affect the absorption of this mineral, in addition also the dietary intake, genetic factors and Vitamin D status take on important roles.

In a previous works, Soto et al. (2015) manufactured fresh meat products enriched with the same calcium salts and reported a higher bioaccessibility, mainly with CCM30 (14.55%). Our results are lower than study suggests that the bioaccessibility of calcium is more related to the food matrix than to the type of salt used. It could be possible that the complex protein network established between the components of cooked meat products could impede calcium liberation even when gastric enzymes are operating. Unless the entire product is not completely digested all of the calcium present will not be liberated.

Conclusions

According to the technological capability, CL and CCM seem to be more appropriate for calcium enrichment than CG which exhibited the worse external appearance. Calcium from CL is slightly more bioaccessible than that from CCM. Nevertheless, similar percentages (close to 10%) were observed.

Results obtained in this study indicate that it is possible to use both salts to manufacture cooked meat products enriched with calcium. The presence of these new and healthy products within of the market would be convenient and beneficial for people experiencing allergic problems or intolerances as for instance to milk lactose.

Acknowledgements

This work was supported by the projects CONSOLIDER-Ingenio 2010 (Ref. CSD2007-00016) and Group of Investigation BSCH-UCM No. 920276 (Ref. GR35/10A).

References

- Abrams J (2010) Setting dietary reference intakes with the use of bioavailability data: calcium. *Am J Clin Nutr* 91 (suppl): 1474S-1477S
- Adluri RS, Zhan L, Bagchi M, Maulik N, Maulik G (2010) Comparative effects of a novel plant-based calcium supplement with two common calcium salts on proliferation and mineralization in human osteoblast cells. *Molec Cell Biochem* 340: 73-80
- Allender PS, Cutler J A, Follman D, Cappuccio FP, Pryer J, Elliott P (1996) Dietary Ca and blood pressure: A meta-analysis of randomized clinical trials. *An Int Med* 124: 825–831
- AOAC (2011) Official Methods of Analysis of AOAC International. 18th Edition, 2005. 4th Revision. Washington D.C. Association of Official Analytical Chemists.
- Appel LJ, Moore TJ, Oberzanek E, Vollmer WM, Svetkey LP, Sacks FM (1997). A clinical trial of the effects of dietary patterns on blood pressure. *New Engl Journal of Med* 336: 1117–1124
- Arvanitoyannis I, Houwelingen-Koukaliaroglou M (2003) Implementation of chemometrics for quality control and authentication of meat and meat products. *Cr Rev Food Sci Nutr* 43 (2): 173-218

498 Ayo J, Carballo J, Solas MT, Jiménez-Colmenero F (2008) Physicochemical and
 499 sensory properties of healthier frankfurters as affected by walnut and fat content.
 500 Food Chem 107: 1547- 1552
 501 Bourne MC (1978). Texture profile analysis. Food Technol 32: 62-66
 502 Cilla A, Lagarda MJ, Alegría A, Ancos B, Cano M.P, Sánchez C, Plaza L, Barberá R
 503 (2011) Effect of processing and food matrix on calcium and phosphorous
 504 bioaccessibility from milk-based fruit beverages in Caco-2 cells. Food Res Int 44:
 505 3030-3038
 506 Cofrades S, Ayo J, Serrano A, Carballo J, Jiménez-Colmenero F (2006) Walnut,
 507 microbial transglutaminase and chilling storage time effects on salt-free beef batter
 508 characteristics. Eur Food Res Technol 222: 548-466
 509 Corpet D. (2011) Red meat and colon cancer: should we become vegetarians, or can we
 510 make meat safer? Meat Sci 89: 310-316
 511 Costa FF, Resende JV, Abreu LR, Goff HD (2008) Effect of calcium chloride addition
 512 on ice cream structure and quality. J.Dairy Sci 91(6): 2165-2174
 513 Daengpork W, Garnjanagoonchorna W, Mine Y (2002) Fermented pork sausage
 514 fortified with commercial or hen eggshell calcium lactate. Meat Sc 62: 199-204
 515 Damodaran S. (2008). Amino acids, peptides and proteins. In: Damodaran S, Parkin KL
 516 and Fenemma OR (eds.) Fennema food Chemistry, 4th edn. CRC Press, Boca Ratón.
 517 FL, pp 217-329
 518 Dendougui F, Schwedt G (2004) In Vitro analysis of binding capacities of calcium to
 519 phytic acid in different food samples. Eur Food Res 219: 409-415
 520 Directive 2008/100/EC (2008) Official Journal of the European Union L285/9-12. 29
 521 October 2008
 522 Fernández-García EL, Carvajal-Lérída I, Pérez-Gálvez A. (2009) In vitro
 523 bioaccessibility assessment as a prediction tool of nutritional efficiency. Nutr Res 29:
 524 751-760
 525 Frontela C, Scarino ML, Ferruzza S, Ros G, Martínez C. (2009) Effect of
 526 dephytinization on bioaccessibility of iron, calcium and zinc from infant cereals
 527 assessed in the Caco-2 cell model in infant formula. World J Gastroenterol
 528 15(16):1977-1984
 529 Gonelli S, Campagna MS, Montagani A, Caffarelli C, Cadrini A, Giorgi G, Nuti R
 530 (2007) Calcium bioaccessibility from a new calcium-fortified orange beverage,
 531 compared with milk, in healthy volunteers. Int J Vit Nutr Res 77(4): 249-254

532 Guégen L, Pointillart A (2000) The bioaccessibility of dietary calcium. *J Am Col Nutr*
533 19(2): 119S-136S

534 Haderslev KV, Jeppesen PB, Mortensen PB, Staun M (2000) Absorption of calcium and
535 magnesium in patients with intestinal resections treated with medium chain fatty
536 acids. *An Int J Gastroenterol Hepatol (Gut)* 46: 819-823

537 Hanson SWF, Olley J (1963) Application of the Bligh and Dyer method of lipid
538 extraction to tissue homogenates. *Biochem J* 89: 101–102

539 Horita C, Morgano M, Celeghini R, Pollonio M (2011) Physico-chemical and sensory
540 properties of reduced-fat mortadella prepared with blends of calcium, magnesium
541 and potassium chloride as partial substitutes for sodium chloride. *Meat Sci* 89: 426-
542 433

543 Heany RP, Weaver CM, Recker RR (1988). Calcium absorbability from spinach. *Am J*
544 *Clin Nutr* 47: 707-709

545 Ikem A, Nwankwoala A, Odueyungbo S, Nyavor K, Egiebor N (2002) Levels of 26
546 elements in infant formula from USA, UK and Nigeria by microwave digestion and
547 ICP-OES. *Food Chem* 77: 429-447

548 Institute of Medicine (2010) Dietary Reference Intakes for Calcium and Vitamin D.
549 Consensus Report. Food and Nutrition Board, November 30

550 International Organization for Standardization ISO (1985). Sensory analysis.
551 Methodology. General guidance (ISO-DP 6658), Genève

552 Joshi P, Brimelow CJB (2002) Colour measurement of food by colour reflectance. In:
553 MacDougall DB (ed) *Colour in food*, CRC Press Woodhead Publishing Ltd.
554 Cambridge, England, pp 80-110

555 Korstanje R, Hoek M (2001) Calcium and others minerals. In: Young J (ed) *Guide to*
556 *functional food ingredients* Surrey, England, pp 197–210

557 MacDougall D . (2002) Colour measurement of food: principles and practice. In:
558 MacDougall DB (ed) *Colour in food*, CRC Press Woodhead Publishing Ltd.
559 Cambridge, England, pp 33-63

560 Margolis KL, Ray RM, Van Horn L et al. (2008).Effect of calcium and vitamin D
561 supplementation on blood pressure. *Hypertension*, 52: 847- 855

562 Martín-Diana AB, Rico D, Frías JM, et al. (2007) Calcium for extending the shelf life
563 of fresh whole and minimally processed fruits and vegetables: a review. *Trends Food*
564 *Sci Technol* 18 (4): 210-218

565 Mekmene O, Le Graët Y, Gaucheron F (2009) A model for predicting salt equilibria in
566 milk and mineral-enriched milks. *Food Chem* 116: 233-239

567 Mesías M, Seiquer I, Navarro MP (2009) Influence of diets rich in Maillard Reaction
568 products on calcium bioaccessibility. Assays in male adolescents and in Caco-2 cells.
569 *J Agric Food Chem* 57: 9532-9538

570 Moreiras O, Carbajal A, Cabrera L, Cuadrado C (2003). Tablas de composición de
571 alimentos. In: Tablas de composición de alimentos: colección “ciencia y tecnología”
572 Grupo Anaya, Humanes de Madrid, Spain, pp 37-70

573 Moreno HM, Carballo J, Borderías J (2011) Application of response surface
574 methodology to study the effect of different calcium sources in fish muscle-alginate
575 restructured products. *Ciència Tecnologia de Aliments* 31(1): 209-216.

576 Moseley K, Jan de Beur S (2010) Osteoporosis in men and women In: Legato MJ (ed),
577 Principles of Gender Specific Medicine, Academic Press-Elsevier, London, England,
578 pp. 716-736

579 Neilson AP, Ferruzi MG (2013) Influence of formulation and processing on absorption
580 and metabolism of flavan-3-ols from tea and cocoa. *An Rev Food Sci Technol* 12:
581 125-151

582 Nelson E, Rogers RR, Frantz JA, Ziegler EE (1996) Palm olein in infant formula:
583 absorption of fat and minerals by normal infants. *Am J Clin Nutr* 64: 291-296

584 Newell GJ, MacFarlane JD (1987) Expanded tables for multiple comparison procedures
585 in the analysis of ranked data. *J Food Sci* 52(6): 1721-1725

586 Peacock M (2010) Calcium metabolism in health and disease. *Clin J Amer Soc Neph* 5:
587 S23-S30

588 Perales S, Barberá R, Lagarda MJ, Ferré R (2005) Bioaccessibility of Ca from milk-
589 based formulas and fruit juices containing milk and cereals estimated by in vitro
590 methods (solubility, dialyzability and interactions with iron and zinc). *J Agric Food*
591 *Chem* 53: 3721-3726

592 Pérez-Álvarez JA, Sayas-Barberá ME, Fernández-López J, Gago-Ga MA, Pagán-
593 Moreno, MJ, Aranda-Catala V (1999) Chemical and color characteristics of Spanish
594 dry-cured ham at the end of the aging process. *J Muscle Foods* 10 (2): 195-201

595 Pérez.Mateos M, Montero P (2002) Effects of cations on the gelling characteristics of
596 fish mince with added nonionic and ionic gums. *Food Hydrocol* 16: 363-373

597 Regulation No 1907/2006 of the European Parliament and of the Council of 18
598 December 2006. Official Journal of the European Union L 396, 30 December 2006

599 Salazar P, García ML, Selgas MD (2009) Short-chain fructooligosaccharides as
600 potential functional ingredient in dry fermented sausages with different fat levels. *Int*
601 *J Food Sci Technol* 44: 1100-1107

602 Savadkoochi S, Hoogenkamp H, Shamsi K, Farahnaky A (2014) Color, sensory and
603 textural attributes of beef frankfurter, beef ham and meat-free sausage containing
604 tomato pomace. *Meat Sci* 97: 410-418

605 Schulz E, Arfai K, Liu X, Sayre J, Gilzanz V (2004) Aortic calcification and the risk of
606 osteoporosis and fractures. *J Clin Endocrinol Metab* 89: 4246-4253

607 Shiowatana J, Kitthikhun W, Sottima U, Promchan J, Kunajiraporn K (2006) Dynamic
608 continuous-flow dialysis method to simulate intestinal digestion for in vitro
609 estimation of mineral bioaccessibility of food. *Talanta* 68: 549-557

610 Sittikulwitit A, Sirichakwal PP, Puwastien P, Chavasit V, Shungpuag P (2004) In vitro
611 bioaccessibility of calcium from chicken bone extracts powder and its fortified
612 products. *J Food Comp Anal* 17(3-4): 321-329

613 Soto AM, García ML, Selgas MD (2015). Technological and sensory properties of
614 hamburgers enriched with calcium. Study of the in vitro bioaccessibility. *Ital J Food*
615 *Sci* 27: 1-9

616 Tobin B, O'Sullivan M, Hamill R, Kerry J (2013) The impact of salt and fat level
617 variation on the physiochemical properties and sensory quality of pork breakfast
618 sausages. *Meat Sci* 93: 145-152

619 Toldrá F, Reig M (2011). Innovations for healthier processed meats. *Trends Food Sci*
620 *Technol* 22: 517-522

621 Totosaus A, Alfaro-Rodrigues RH, Pérez-Chabela ML (2004) Fat and sodium chloride
622 in sausages using κ-carragenan and other salts. *Int J Food Sci Nutr* 55(5): 371–380

623 Van der Heer RM, Miret S, Slettenaar M et al. (2009) Calcium absorption from fortified
624 ice cream formulations compared with calcium absorption from milk. *J Am Diet*
625 *Assoc* 109: 830-835

626 Viuda M, Ruiz Y, Fernández J, Pérez JA (2010) Effect of added citrus fibre and spice
627 essential oils on quality characteristics and shelf-life of mortadella. *Meat Sci* 85:
628 568-576

629 Weaver MC (1998) Calcium in food fortification strategies. *Int Dairy J* 8: 443-449.

630 Zamorano J, Gambaruto M. (1997) Contribution to improving the meat water holding
631 capacity test by the filter paper press method. A comparison of three methods for
632 measuring areas. *Meat Sci* 46: 129-137

Table 1. Calcium salt amount added to experimental sausages to provide 20, 30 or 40% of the RDA

Batch	g/100g
Control	-
CG20	2.24
CG30	3.36
CG40	4.48
CL20	1.54
CL30	2.31
CL40	3.08
CCM20	0.93
CCM30	1.40
CCM40	1.87

Table 2. Effect of the calcium salts assayed in the water holding capability (WHC) and the pH of experimental sausages

Batches	WHC	pH
Control	43.26±2.16 ^b	6.13±0.11 ^a
CG20	43.59±2.92 ^b	5.71±0.10 ^{bc}
CG30	46.32±2.92 ^b	5.60±0.12 ^c
CG40	46.05±3.72 ^b	5.64±0.09 ^c
CL20	43.75±3.30 ^b	6.10±0.12 ^a
CL30	45.02±3.57 ^b	6.16±0.07 ^a
CL40	48.53±6.23 ^b	6.16±0.17 ^a
CCM20	47.93±6.69 ^b	5.90±0.42 ^{ab}
CCM30	54.99±4.97 ^a	5.79±0.10 ^{bc}
CCM40	44.69±8.68 ^b	5.75±0.08 ^{bc}

Data are the means ± S.D.

Values in column with the same letter are not different ($p>0.05$)

Table 3. Influence of the calcium salts in colour parameters of experimental sausages

Batches	L*	a*	b*	Hue Angle	Saturation Index	ΔE
Control	72.94±0.59 ^d	12.61±0.32 ^a	6.48±0.29 ^c	25.10±2.18 ^d	14.84±1.23 ^a	
CG20	75.85±1.33 ^{bc}	12.15±0.99 ^a	7.03±0.67 ^b	29.88±3.64 ^{abc}	13.82±1.04 ^b	3.00±0.15 ^e
CG30	77.68±0.89 ^a	11.12±0.69 ^b	6.85±0.57 ^{bc}	31.46±2.72 ^a	12.88±1.28 ^b	4.79±0.10 ^a
CG40	76.45±0.81 ^b	11.63±0.48 ^b	7.13±0.47 ^{ab}	31.22±2.33 ^a	13.41±1.43 ^b	3.83±0.09 ^c
CL20	69.16±1.26 ^e	12.96±0.47 ^a	6.62±0.47 ^{cd}	23.25±3.31 ^d	15.25±4.71 ^a	3.96±0.15 ^c
CL30	77.31±0.97 ^a	12.20±0.53 ^a	7.41±0.39 ^a	31.28±3.18 ^a	14.05±1.19 ^{ab}	4.39±0.11 ^b
CL40	75.85±1.50 ^d	12.75±0.68 ^a	7.39±0.72 ^a	27.99±4.45 ^c	15.38±1.30 ^a	3.02±0.17 ^e
CCM20	76.41±1.31 ^{ab}	12.11±0.81 ^a	6.97±0.47 ^b	30.19±4.35 ^{ab}	14.49±2.38 ^{ab}	3.66±0.15 ^d
CCM30	75.43±0.99 ^c	12.49±0.72 ^a	6.66±0.49 ^{bc}	28.44±4.28 ^{bc}	14.69±2.47 ^{ab}	2.59±0.11 ^f
CCM40	75.34±1.41 ^c	12.51±0.40 ^a	6.57±0.34 ^{bc}	28.10±3.79 ^{bc}	14.66±2.46 ^{ab}	2.41±0.16 ^g

Data are the means ± S.D.

Values in column with the same letter are not different (p>0.05)

$$\Delta E = (\Delta L^*{}^2 + \Delta a^*{}^2 + \Delta b^*{}^2)^{1/2}$$

Table 4. Influence of the calcium salts in textural parameters (TPA) of experimental sausages

Batches	Hardness (N)	Adhesiveness (N s)	Springiness (cm)	Cohesiveness (ratio)	Gumminess (N)	Chewiness (N cm)
Control	76.28±0.72 ^{ab}	-0.27±0.03 ^c	0.41±0.03 ^{bcd}	0.71±0.01 ^{ab}	54.16±0.54 ^{abc}	22.21±1.45 ^a
CG20	70.44±3.61 ^{ab}	-0.98±0.26 ^a	0.52±0.04 ^a	0.72±0.01 ^{ab}	50.72±4.11 ^{abc}	26.37±4.86 ^a
CG30	67.58±9.99 ^{ab}	-0.79±0.07 ^b	0.50±0.03 ^{ab}	0.72±0.09 ^{ab}	48.66±1.32 ^{bc}	24.33±1.65 ^a
CG40	72.10±10.09 ^{ab}	-0.93±0.18 ^{ab}	0.49±0.05 ^{ab}	0.72±0.06 ^{ab}	51.91±6.74 ^{abc}	25.44±5.33 ^a
CL20	77.15±9.35 ^a	-0.98±0.54 ^a	0.39±0.06 ^{cd}	0.76±0.04 ^{ab}	58.63±4.11 ^a	22.87±4.86 ^a
CL30	70.88±3.23 ^{ab}	-0.74±0.46 ^b	0.38±0.08 ^d	0.78±0.08 ^a	55.29±2.50 ^{ab}	21.01±6.25 ^a
CL40	57.09±6.68 ^c	-0.38±0.15 ^c	0.42±0.04 ^{bc}	0.77±0.06 ^{ab}	43.96±0.52 ^{bc}	18.46±1.96 ^a
CCM20	68.39±9.42 ^{ab}	-0.42±0.09 ^{bc}	0.41±0.02 ^{bcd}	0.74±0.03 ^{ab}	50.61±5.30 ^{abc}	20.75±3.16 ^a
CCM30	71.85±15.26 ^{ab}	-0.64±0.21 ^b	0.42±0.07 ^{bc}	0.68±0.03 ^b	48.86±9.42 ^{bc}	20.52±7.00 ^a
CCM40	64.84±9.82 ^{ab}	-0.30±0.11 ^c	0.43±0.08 ^{abc}	0.68±0.02 ^b	44.09±6.43 ^c	18.96±5.95 ^a

Data are the means ± S.D.

Values in column with the same letter are not different (p>0.05)

Figure 1: Principal Component Analysis: Description of the main variations in colour of the cooked sausages.

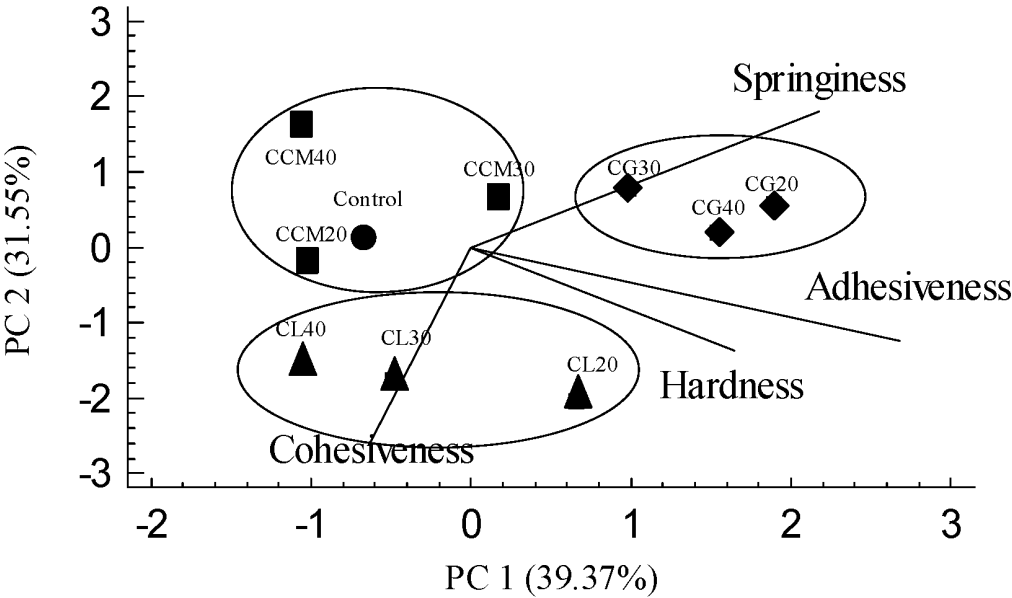


Table 5. Influence of the calcium salts in the sensory properties and the overall acceptability of experimental sausages

Batches	Odour	Colour	Taste	Texture	Overall acceptability
Control	6.84±1.11 ^{ab}	6.69±0.99 ^a	6.78±0.70 ^a	6.84±0.86 ^a	6.90±0.71 ^a
CG20	6.98±1.24 ^{ab}	6.62±1.44 ^a	6.86±1.48 ^a	6.47±1.73 ^a	6.58±1.54 ^{ab}
CG30	6.82±1.03 ^{ab}	5.65±1.84 ^a	6.59±1.47 ^a	6.82±1.48 ^a	6.03±1.42 ^{ab}
CG40	7.04±1.21 ^a	5.24±1.76 ^a	4.98±1.89 ^b	6.57±1.30 ^a	4.94±1.80 ^c
CL20	6.36±1.78 ^{ab}	6.63±1.92 ^a	6.76±1.41 ^a	6.55±1.96 ^a	6.61±1.28 ^{ab}
CL30	6.30±1.24 ^b	5.93±1.56 ^a	6.42±1.78 ^a	6.40±1.48 ^a	6.02±1.51 ^{abc}
CL40	6.38±1.48 ^{ab}	5.99±1.84 ^a	4.99±1.57 ^b	5.75±1.75 ^a	5.53±1.88 ^{bc}
CCM20	7.20±1.48 ^a	6.53±1.16 ^a	7.13±1.98 ^a	7.56±1.70 ^a	6.94±1.70 ^{ab}
CCM30	6.85±1.87 ^{ab}	6.40±1.39 ^a	6.46±1.76 ^a	6.73±1.56 ^a	6.44±1.58 ^{ab}
CCM40	7.00±1.38 ^a	6.41±1.12 ^a	6.79±1.69 ^a	6.85±1.13 ^a	6.56±1.13 ^{ab}

Data are the means ± S.D.

Values in column with the same letter are not different (p>0.05)

Figure 2: Principal Component Analysis: Description of the main variations at the hedonic test.

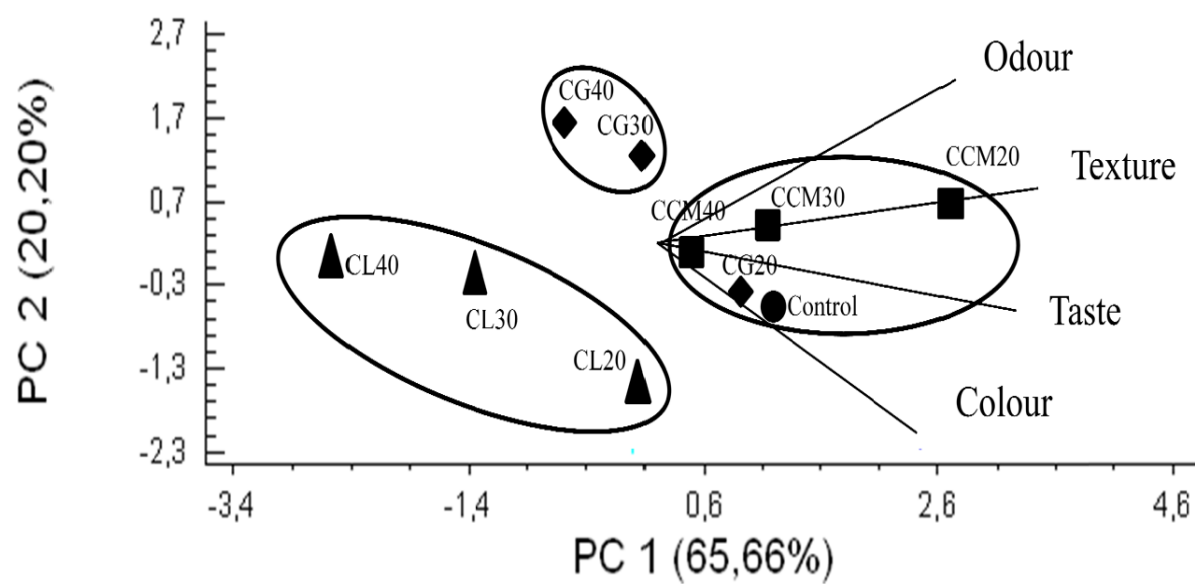


Table 6. Calcium content in the different phases of the *in vitro* digestion and calcium bioavailability (%) from bologne sausages

Calcium salt	Sample*	Gastric Phase Ca*	Non Dialyzed Ca*	Dialyzed Ca*	Bioavailability (%)
CL40	473.06±24.49	427.64±25.75	88.66±5.27	47.92±0.51	9.94
CCM40	436.85±26.22	396.88±23.60	79.96±4.87	35.95±0.40	8.23

Data are the means ± S.D.

*mg Ca/100 g bologna sausage

Bioavailability (%) = [Dialyzed Ca / Ca sample] * 100

4.4. Technological and sensory properties of calcium enriched dry fermented sausages. Study of the calcium bioavailability.

Enviado a Journal of Food Quality

Journal of Food Quality - Manuscript ID JFQ-2015-266

21-Jul-2015

Dear Miss Selgas:

Your manuscript entitled "TECHNOLOGICAL AND SENSORY PROPERTIES OF CALCIUM ENRICHED DRY FERMENTED SAUSAGES. STUDY OF THE CALCIUM BIOAVAILABILITY" has been successfully submitted online and is presently being given full consideration for publication in the Journal of Food Quality.

Your manuscript ID is JFQ-2015-266.

Please mention the above manuscript ID in all future correspondence or when calling the office for questions. If there are any changes in your street address or e-mail address, please log in to Manuscript Central at <https://mc.manuscriptcentral.com/jfq> and edit your user information as appropriate.

You can also view the status of your manuscript at any time by checking your Author Center after logging in to <https://mc.manuscriptcentral.com/jfq>.

Thank you for submitting your manuscript to the Journal of Food Quality.

Sincerely,
Journal of Food Quality Editorial Office

**TECHNOLOGICAL AND SENSORY PROPERTIES OF CALCIUM
ENRICHED DRY FERMENTED SAUSAGES. STUDY OF THE
CALCIUM BIOAVAILABILITY**

Journal:	<i>Journal of Food Quality</i>
Manuscript ID:	JFQ-2015-266
Manuscript Type:	Original Article
Date Submitted by the Author:	21-Jul-2015
Complete List of Authors:	SOTO, ANA MARIA; Veternary Faculty, Complutense University, Nutrición, Bromatología y Tecnología de los Alimentos GARCIA, MARIA LUISA; Veternary Faculty, Complutense University, Nutrición, Bromatología y Tecnología de los Alimentos Selgas, Maria Dolores; Veternary Faculty, Nutrición, Bromatología y Tecnología de los Alimentos
Keywords:	Bioactive compound, Calcium, fortification, fermented meats, functional food

SCHOLARONE™
Manuscripts

TECHNOLOGICAL AND SENSORY PROPERTIES OF CALCIUM ENRICHED DRY FERMENTED SAUSAGES. STUDY OF THE CALCIUM BIOAVAILABILITY

ANA M. SOTO, M. LUISA GARCIA and M. DOLORES SELGAS

Department Nutrición, Bromatología y Tecnología de los Alimentos. Veterinary Faculty. Complutense University. 28040 Madrid. Spain

ABSTRACT

Dry fermented sausages (DFS) were enriched with calcium (Ca) incorporating three Ca salts (gluconate, lactate and citrate-malate) in sufficient amounts to assure that 100 g of DFS gave 20-40% of the daily Ca RDA. Technological and sensory properties of the Ca enriched DFS meat products were studied. In general terms, the enriched DFS were similar to the control batch manufactured without Ca addition, except for those batches supplemented with Ca gluconate which exhibited a lower sensory quality, in consequence this salt was discarded. The microbiota was not affected by any of the salts assayed. Calcium bioavailability of the experimental sausages was determined by an *in vitro* assay revealing to be close to 10% concerning the two salts studied. This value lies within of the average absorption limits established for other enriched foods. In view of the results obtained, this type of meat product could be enriched with either Ca salt.

PRACTICAL APPLICATIONS

Calcium is essential for the correct functioning of the human organism. It plays important roles throughout several physiological activities mainly with respect to the ossification process. The calcium daily allowance recommended by international Health Organisms is close to 800-1000 mg. Calcium fortified products, between them the meat products, offer a good alternative to augment calcium intake. The industrial manufacturing of dry fermented sausages has shifted in recent years developing new and healthier products to improve their nutritional value. The calcium bioavailability from these meat products encompassed close to 10%, percentages being inside the average absorption limits established in other foods. These new dry fermented sausages will help to expand the market meat product range while simultaneously will allow enhancing consumption.

SHORT TITLE:**TECHNOLOGICAL PROPERTIES AND BIOAVAILABILITY OF
CALCIUM ENRICHED DRY SAUSAGES****Key words:**

Technological properties, sensory properties, bioavailability, calcium salts, dry fermented sausages.

Corresponding author:

TEL: +34 913 943 745.

FAX: +34 913 943 743.

EMAIL: selgar@ucm.es

INTRODUCTION

The industrial manufacturing of dry fermented sausages (DFS) has shifted in recent years developing new together with healthier products which have helped to expand the market product range while simultaneously allowing enhancing consumption. Today, the fermented sausage varieties available all-around of the world are nearly equal to those of the cheese trade (Hutkins, 2006). Among the most frequently manufactured DFS in Spain stands out the *salchichón*. This product is made up of a mix of pork and fat meats seasoned with characteristic spices and differs from other DFS due to its acidity as well as its semi-hard consistency obtained after a ripening period (Comi *et al.*, 2005).

Due to their nutritional composition, DFS provide consumers with a substantial amount of macronutrients covering proteins and lipids which sustain a high nutritional quality, together with essential micronutrients such as iron. Nevertheless, some nutrients necessary for a healthful living, as for instance vitamins or minerals are practically absent or else present in trace amounts. Calcium corresponds to one of these nutrients.

Calcium is essential for the correct functioning of organisms. It plays important roles throughout several physiological activities including the maintenance of cellular functions or also with respect to the endochondral ossification process hence essential for a correct skeletal development (Guéguen and Pointillart, 2000; Peacock, 2010). Insufficient calcium uptake is related to rickets in children, osteoporosis in the elderly and arterial hypertension among others (Schulz *et al.*, 2004; Adluri *et al.*, 2010; Moseley and Jan de Beur, 2010).

The European Parliament (Directive 2008/100/EC) determined a Calcium Recommended Dietary Allowance (RDA) of 800 mg/per day. The US Institute of Medicine (IOM, 2010) recommended a daily calcium intake of 1,000 mg with respect to people aged 19 to 50 years.

Dairy products comprise the principal source of calcium in Western countries mainly due to milk's vitamin D and protein (casein) content which increase calcium bioavailability (Van der Heer *et al.*, 2009; Guéguen and Pointillart, 2000) Nevertheless, the population percentage with lactose intolerance problems (Weaver, 1998) experiences an inadequate milk ingest and consequently of calcium. Calcium fortified products offer a good alternative to augment calcium intake.

There are different ways of calcium enrichment as for instance the liquid or powdered milk addition (Sittikulwitit *et al.*, 2004) inclusive even egg shell calcium additive (Daengpork *et al.*, 2002), yet the most common strategy entails the addition of calcium salts. Among the salts that have been tested are calcium phosphate, citrate (Mekmene *et al.*, 2009), carbonate (Van der Hee *et al.*, 2009), chloride (Singh *et al.*, 2009; Costa *et al.*, 2008), lactate (Daengpork *et al.*, 2002), gluconate (Martín-Diana *et al.*, 2007) or calcium citrate-malate (Soto *et al.*, 2015). Korstanje and Hoek (2001) as well as Ueda and Taira (2013) reported that calcium gluconate, lactate and citrate-malate are all characterized by their high bioavailability, with values close to reaching 30%. The Regulation No. 1907/2006 (Official Journal of the European Union) allows for the incorporation of different calcium sources into food.

Meat product enrichment with calcium has been considered a good opportunity to improve their nutritional value. The addition of calcium has an additional advantage of increasing the amount of binding calcium to the heme iron thus suppressing the hemoprotein toxicity as a promoter of colon carcinogenesis via the N-nitrosation of fat peroxidation (Corpet, 2011; Toldrá and Reig, 2011).

This work has focused on gaining knowledge on the technological and nutritional properties of DFS (*salchichón*) enriched with calcium by the addition of three different calcium salts, namely calcium lactate (CL), calcium gluconate (CG) and citrate-malate calcium (CCM). In order to establish the calcium bioavailability, an *in vitro* study simulating the passage through the intestinal epithelium was undertaken. The *in vitro* methods for assessing bioavailability constitute a good alternative to the *in vivo* procedures (Fernández-García *et al.*, 2009; Neilson *et al.*, 2013). Although such methods estimate only the fraction of the element that is available for absorption, values obtained constitute a good approximation to what happens during the first step of the *in vivo* mineral absorption process (Perales *et al.*, 2005).

To the end of our knowledge, it is the first time that the calcium bioavailability is studied on enriched dry fermented sausages. Therefore, if the designed dry fermented sausages have a good quality and the calcium bioavailability is noteworthy, they could be considered as a new type of meat products useful to contribute to the daily calcium intake.

MATERIAL AND METHODS

Experimental design and sausage manufacture

The meat together with the back pork fat was obtained from a local market. Calcium lactate (CL) and calcium gluconate (CG) were provided by Panreac (Castellar del Valles, Spain) while citrate-malate calcium (CCM) was supplied by the Jost Chemical (St. Louise, USA) company. All chemicals possessed a purity >98% based on the anhydrous substances. The different calcium salts were added in sufficient amounts to ensure that 100 g of the final product provided 20, 30 and 40% of the Ca RDA (1,000 mg/per day) (IOM, 2004). Calcium salts were added to the ground meat and mixed in with the spices.

Manufacturing of the dry-fermented sausages was carried out in our Pilot Plant of the Department and according to a traditional “*salchichón*” formula: 75% pork meat, 25% pork backfat and 5% of a commercial spice and additive mixture (Salavi®, Anvisa, Madrid). Meat was chopped in a grinder (C10 Grinder, Falsf Co., Spain) adding the mixture of spices together with the respective calcium salt. A starter culture composed by *L. sakei* and *S. carnosus* (Bactoferm™, Chr. Hansen, Barcelona, Spain) was used (0.25 g/kg). Ten batches (2 kg each) were completed: one batch was a control lacking supplementary calcium while the remaining nine were fortified with the three amounts of the three assayed salts. Calcium salt amounts were calculated taking into account the calcium content of the molecules of each corresponding salt along with the water loss after sausage ripening of nearly 50% (Ordóñez, *et al.*, 1999) (Table 1).

The batches were stuffed into artificial casings (50 mm diameter) which had previously been humidified with lukewarm water (Betex-Pack, Madrid). Ripening was carried out in a laboratory ripening cabinet (Binder mod. KBF 115 Tuttlingen, Germany) programmed: 48 h at 22°C and a relative humidity (RH) of 90%, followed by a decreasing phase of 24 h at 22°C / 90% RH after which 24 h at 16°C / 88% RH down to 13°C / 85% RH until the end of the experiment (21 days). Manufacture was performed in duplicate.

Physicochemical analysis.

Water activity was determined by means of a Decagon CX1 dew point hygrometer (Decagon Devices, Pullman, WA, USA); the pH was measured with a Crison 2001 pH-meter. Dry matter was determined according to the AOAC (2011). Measurements were made in quintuplicate.

Calcium determination.

Calcium determination was performed according to the methodology described by Ikem *et al.*, (2002). Firstly, 5 g of every batch were defatted with a mixture of chloroform:methanol (1:1) according to the methodology by Hanson and Olley (1963). Then, samples were freeze-dried and kept under refrigeration until their analysis

For the microwave digestion, 1.0 g of each sample was subjected to an acid digestion with 6 ml of HNO₃ and 2 ml of H₂O₂ (Suprapur, Merck) in a microwave digestion system and diluted to 10 ml with deionized water (Milli-Q Millipore). The blank digestion was carried out in the same way. Digestion conditions for the microwave system consisted of the following: 2 min-250 W, 2 min-0 W, 6 min- 250 W, 5 min- 400 W and last 8 min-550 W. The analysis was carried out with a Perkin Elmer DV 3300 inductively coupled plasma-optical emission spectrometer (ICP-OES). All determinations were carried out in duplicate. Bovine muscle BCR No 184 (Sigma-Aldrich, Saint-Louis, MO, USA) was used as the reference (Cáceres *et al.*, 2006; Soto *et al.*, 2015). The experimental values obtained were in the range of the certificate value with their corresponding uncertainties.

Microbiological analysis.

The microbiota was quantified in duplicate by decimals dilutions in Plate Count Agar (PCA) for total viable counts (TVC), MRS (pH 5.6) for lactic acid bacteria (LAB) and Mannitol Salt Agar (MSA) for *Micrococcaceae*. All culture media were purchased by OXOID (Oxoid, Basingstoke, England). Plates were incubated at 32°C/48 h under aerobic conditions.

Colour.

Colour was measured with a Chroma Meter CR-200 colorimeter (Minolta Co. Osaka, Japan) using the colour Space CIEL*a*b*. The colorimeter was calibrated with a rose

tile ($L^* 44.88$; $a^* 25.99$; $b^* 6.67$) and a D-65 illuminant source. The parameters determined were L^* , a^* and b^* ; the Hue Angle (tonality) and the Saturation Index (vivacity) were also estimated according to Artés *et al.*, (2002). Samples consisted of 3 mm thick slices and measurements were taken at room temperature, after cutting to prevent colour degradation resulting from light or oxygen (Pérez-Álvarez *et al.*, 1999^a). Measures were performed at least 20 fold using different slices of each batch.

To relate the actual colour difference values (ΔE) to the visually perceived differences, Euclidean relations were determined (Savadkoobi *et al.*, 2014):

$$\Delta E = (\Delta L^{*2} + \Delta a^{*2} + \Delta b^{*2})^{1/2}$$

with ΔE being equal to the square root of the sum of squared differences among the L^* , a^* and b^* coordinates of the calcium added batches and the control batch. The equation represents the comprehensive variation contribution of the three colour indexes.

Texture analysis.

The Stable Micro System Mod. TA.XT 2i/25 texture analyser was used to evaluate the samples' textural properties. The texture profile analysis (TPA) was performed for each sample on the central cores of eight slices (1 cm high and 2.5 cm diameter), which had been compressed twice to 50% of their original height. The following parameters were determined: Hardness (N), Adhesiveness (N s), Springiness (cm), Cohesiveness (ratio), Gumminess (N) and Chewiness (N cm).

A Shearing Analysis was also performed making use of a Warner-Bratzler HDP/BS blade working by a knife-edge attached to the same texture analyser. Shear force (N) and the Work of shearing (N s) were measured. Samples comprised also eight cores (1 cm high and 2.5 cm diameter) of each sausage. The crosshead speed of both tests amounted to 2 mm/s.

Sensory analysis.

A Hedonic Test was carried out using a non-structured 10 cm hedonic scale (0=dislike extremely and 10=like extremely) to rate odour, colour, texture, taste and overall acceptability. Thirty five untrained assessors were selected according to their habits, acquaintance with the sausages to be analyzed, their sensitivity and the ability to evaluate samples. The analysis was performed in individual booths according to the

International Standards Organisation (ISO-DP6658) (1985) under white fluorescent lights. Two slices of each sample (2 mm high approximately) were served to the assessors. Unsalted crackers and room temperature water were also provided to clean the palate between samples.

A Preferential Test was also performed in which the assessors were asked to rank the coded samples according to the degree of liking or disliking. Three series were implemented. Each series consisted of three batches manufactured with the respective calcium salt's three concentrations (20, 30 and 40% RDA). In every session one series was analyzed and the sample ranked first was granted 3 points while the other samples were assigned 2 and 1 points respectively. This test needed fluorescent lights to be performed. Appraisals were carried out at least 1 hour apart in order to avoid the fatigue of the assessors.

Bioavailability.

Calcium bioavailability was studied by means of a static *in vitro* test which simulates the gastric and intestinal phases of the digestion process (Shiowatana *et al.*, 2006). All enzymes were supplied by Sigma-Aldrich (St Louis, MO, USA) and the reactives were furnished by Panreac (Barcelona, Spain). Ten grams of sausage were homogenized (Polytron® SEV-geprüft., Littau-Luzerne, Switzerland) with 50 ml of 0.2 M phosphate buffer. The pH was adjusted to 2.0 with 5 N HCl. To simulate the gastric phase, 0.33 ml of pepsin suspension [0.16 g pepsin (EC 232-629-3)/ 1 ml 0.1 N HCl] were added. The samples were next incubated in a shaker (130 rpm) at 37 °C/2 h (Thermo Scient. MaxQ4000, Iowa, USA).

To simulate the intestinal digestion phase, 20 g of the gastric digest were mixed with 5 ml of pancreatin-bile conjugate, [0.2 g of pancreatin from porcine pancreas (EC 232-468-9) and 1.25 g of porcine bile extract (EC 232-369-0) dissolved in 50 ml of 1 M NaHCO₃]. The pH was adjusted to 7-7.5 with 2 M NaHCO₃ and the total digest volume was measured.

Additional 20-g aliquots of the gastric digest were in contact with the cellulose dialysis tube encompassing a molecular cut-off weight of 12000-14000 Da and a 25 mm diameter (Sigma Aldrich). Distilled water (25 ml) and the same before determined 2 M NaHCO₃ volume were added inside of the tube. Flasks containing the aliquots gastric digest and the dialysis tube were incubated at 37 °C in a shaker (130 rpm) until the pH

reached 5. Finally, 5 ml of pancreatin-bile conjugate were added to the gastric phase; after it were incubated for another 2 h at 37 °C. Upon completion of the dialysis process, the dialyzed Ca (inside of the dialysis tube) and the non-dialyzed Ca (outside of the dialysis tube) were determined. This last quantity, besides of the solid delivery Ca, corresponds to the Ca that would be eliminated. The difference between the amount of calcium detected in these two phases and that determined in the gastric phase was considered as the calcium remaining in the solid residue (solid delivery) which would be eliminated.

Bioavailability was expressed as a percentage:

$$\text{Bioavailability (\%)} = [\text{Dialyzed Ca (mg)} / \text{Ca sample (mg)}] * 100$$

Statistical analysis.

The effect of the calcium salt level was studied by a two-way analysis of variance (ANOVA) whose factors were represented by the Ca salt type and concentration. Experiments were analysed separately and values of $p < 0.05$ were considered to be significant.

The Preferential Test was undertaken according to the procedure of multiple comparisons established by Newell and MacFarlane (1987).

A Principal Component Analysis (PCA) was performed on the correlation matrix of the sensory parameter averages. Results were represented as biplots mapping batches (PC-scores) and attributes (PC-loadings). The Statgraphics Centurion XVI.I (Statistical Graphics Corporation, Herndon, VA, USA) software program was used to carry out the statistical evaluation.

RESULTS AND DISCUSSION

Physicochemical analysis

Water activity and pH decreased progressively during the ripening period. In this way, parameter a_w ranged between 0.962 of the initial mixture down to 0.882 of the ripened control batch, whereas the pH values spanned from 6.16 of the initial mixture to 4.98 of the ripened control batch. No significant differences were observed between the control and the enriched batches, independent of the calcium salt applied or of the concentration added. The dry matter content increased significantly as the ripening period progressed,

values ranged from 38.23 ± 1.04 of the original mixture to 59.56 ± 0.32 of the ripened control batch and between 58.91 ± 3.59 to 61.44 ± 3.13 as regarded the ripened sausages of the enriched batches. All values obtained were within of the range previously described by several authors with respect to different DFS types (Ordóñez *et al.*, 1999; Herrero *et al.*, 2007; Yang *et al.*, 2007; Calvo *et al.*, 2008; Stollewerk *et al.*, 2011).

Microbiological counts

The bacterial counts of the control and the enriched batches were similar and independent of the calcium salt type or concentration added. Figure 1 displays the microbiota count evolution of the CL30 enriched sausages throughout of the ripening period. The remaining batches inclusive the control behaved in a similar fashion. The TVC ranged from the 10^7 cfu/ml of the original mixture up to values close to 10^{10} cfu/ml at the end of the ripening period; LAB counts showed initial values of 10^6 cfu/ml and final values close to 10^9 cfu /ml. The *Micrococcaceae* counts remained close to 10^6 cfu /ml during the entire course of the ripening period. Figure 1 also shows the relationship between the LAB increase and pH decrease which was more pronounced for the fifth day of ripening. These data fit into the range described by other authors for these meat product types (Ordóñez *et al.*, 1999; Ammor and Mayo, 2007; Gurbuz *et al.*, 2009; Zhang *et al.*, 2010; Galán *et al.*, 2011).

Colour properties

In relation to the control all other batches showed similar lightness values (L^*) (Table 2), with the exception of those enriched with the CCM salt which displayed the lowest values ($p < 0.05$). These slight differences had previously been observed by other authors such as Gimeno, Astisaran, and Bello (2001) for DFS with calcium salts added as a substitute of NaCl. Choi *et al.*, (2014) reported that whatever calcium salt addition did not produce a great meat product lightness difference.

Compared to the control, the most relevant change was the a^* increment of the enriched batches in general and those supplemented with CL in particular being more evident for the CL30 and CL40 ($p < 0.05$) batches. In this sense, Fernández *et al.*, (2007) described that the formation of lactic acid derived from this calcium salt could increase the formation of nitrosomyoglobin which is related to the product's redness. Yellowness

produced similar results: neither batches enriched with CL nor with CCM presented differences amongst them, independently of the amount of calcium salt added. Nonetheless, the CG and the control batches displayed the lowest values.

The Hue Angle and the Saturation Index are secondary factors which presented analogous tendencies to those exhibited by the primary parameters. In this manner, both evidenced similar behaviours to those of the a^* and b^* parameters and accordingly lower values were detected for the CG added batches.

The ΔE ranged between 5.11 ± 0.42 to 1.72 ± 0.54 . According to Savadkoobi *et al.*, (2014), colour modifications measured instrumentally can be considered noticeable visual changes when ΔE values are higher than 2. Our data indicates that with the exception of treatment CL20, all of the enriched batches could visually be differentiated from the control treatment. The ΔE of batch CG40 was considered as inconsistent data.

A great number of parameters influencing DFS colour have been described. Fernández *et al.* (2000) pronounced that colour modification during the dry-curing period of these products could be attributed to the different myoglobin states. Jakobsen and Bertelsen (2002) observed colour change only in those products without CO_2 , which is to say O_2 presence favours product redness. Gimeno *et al.*, (2001) showed that the chemical nature of the compounds employed as NaCl substitutes influenced colour development even when equivalent ionic strengths were provided, while Pérez-Álvarez, *et al.* (1999^b) indicated that the muscle types made use of to manufacture products could vary colour parameters, mainly with respect to L^* and to the a^*/b^* ratio. Sausage composition, meat particle size and ripening time have also been described to act as agents exerting a capacity to influence colour parameters (Calvo *et al.*, 2008). In the present study, colour changes, mainly respective to yellowness, seem to have been more related to the calcium type added rather than to their quantities.

Texture properties

Results are indicated in Table 3. In general terms, hardness decreased according to calcium salt increases, with the CG40 and CL40 batches evidencing the lowest values ($p < 0.05$). Likewise, these same batches manifested the lowest adhesiveness and the lowest springiness (CG40) or cohesiveness (CL40) and, consequently, this last batch exhibited with significant differences ($p < 0.05$) the lowest gumminess and chewiness in relation to the control batch.

These differences could be related to the calcium interactions with the DFS components yielding meat product consistency reductions. According to Damodaran (2008), the calcium addition to meat products could favour a disorder in the protein network restructuring causing water molecules to be retained, thus resulting in a decreased of the meat product firmness. Similar data have also been reported by other authors such as for instance Herrero *et al.*, (2007).

Sensory properties

Upon evaluation of the sensory DFS properties (Table 4) it was determined that the lowest punctuations obtained corresponded to the batches enriched with CG with respect to colour as well as texture and mainly regarding taste. In consequence these batches also embodied the lowest overall acceptability. It is probably due to the small white crystals formed by calcium gluconate which gave a mouth full of gravel sensation promoting negative appraisals. This perception had previously been described by our group in connection with fresh meat products (Soto *et al.*, 2015). The bad results obtained by the CG batches indicate that this Calcium salt is not the most adequate to undertake meat product enrichment and therefore was discarded from the further analysis (bioavailability).

The highest acceptability observed corresponded to the batches enriched with 30% of the RDA and appreciation values decreased when the calcium salt amount increased up to 40% of the RDA. In this line, batches CL30 and CCM30 were considered as the most appropriate in view of their sensory quality.

Figure 2 depicts a sample configuration projection in relation to the sensory analysis. PC1 was related to three basic parameters (colour, texture and taste) and accounted for 66.13% of the total variability while PC2 accounted only for 22.86% and was mainly linked to odour. The remaining variability (11%) was discarded and corresponded to the third and fourth principal components. Two clusters were obtained; one of them included the CG batches while the other cluster included all other batches plus the control. Clustering agreed with the data retrieved from the sensory analysis (Table 4) in which the CG batches had obtained the lower punctuations

In relation to the Preferential Test, samples were ordered from the most appreciated to the least valued by assessors. No significant differences ($p>0.05$) were detected among the enriched batches (data not shown).

Flores *et al.* (2005) reported similar results for dry fermented sausages enriched with CaCl_2 , while as regards dry-cured hams Armenteros *et al.* (2012) described that the addition of calcium salts (i.e. calcium chloride) could decrease product acceptability. Other authors (Lawless *et al.*, 2003) have indicated that divalent cations are responsible of bitter tastes, producing metallic, astringent and irritative sensations, in consequence justifying a final product acceptability decrease.

Bioavailability

According to the results described previously, only batches with the CCM30 and CL30 were further studied considering mainly their sensory properties. In order to establish calcium bioavailability, an *in vitro* assay was performed.

The calcium present in the gastric (GP) and in the intestinal (IP) phases was analysed (see 2.8 section): the dialyzed calcium, representing the calcium available for absorption as opposed to the non-dialyzed calcium, representing the calcium which is not absorbed and would be lost with solid residues. The calcium bioavailability percentages were expressed as a relation between the amounts of dialyzed calcium over the calcium content present in 100 g of the meat products. Results are shown in Table 5.

The observed gastric phase calcium losses were higher than 55% of the calcium added regarding both types of salts used. Therefore, Ca levels of the GP amounted to 98.55 and 94.26 with respect to the CL30 and CCM30 batches. Results could be due to the DFS matrix complexity (matrix effect) which is related to the numerous links established between the meat product components. Taking into account that the DFS structure is a gel formed due to a pH decrease during the first ripening days, it is possible that gastric enzymes do not digest meat products entirely —although fully working— thus preventing complete calcium liberation which would be eliminated with the faeces..

This fact could also justify the small intestinal phase calcium quantities determined (dialyzed Ca and non-dialyzed), i.e. the dialyzed Ca amounts theoretically crossing the enteric membrane were 29.68 (CL30) and 27.47 (CCM30) mg Ca/100 g DFS. The calculated solid deliveries were equal to 55.93 mg respective to the CL batch and 55.78 mg in the case of the CCM one. The bioavailability percentages were 10.54 regarding batch CL30 and 9.47 concerning batch CCM30.

These calcium absorption percentages were low in comparison to those that have been described for milk (27.6%) (Heany *et al.*,1988). Nelson *et al.*, (1996) ascertained

39% in an infantile milk formula; nonetheless, when the formula was enriched with calcium and fibre absorption decreased down to 10%. In this way, Dendougui and Schewedt (2004) determined that bioavailability is affected by several factors, as for instance the product's pH or fibre presence (Fernández *et al.*, 2007). These authors also indicated that bioavailability could not exceed a 10% of all of the calcium present in a product due to food component interferences.

Heany *et al.*, (1988) and Van der Heer *et al.*, (2009) reported percentages next to 27.6% and between 15 – 44% respectively for milk and milk products (ice-cream). Teucher *et al.*, (2006) suggested that caseins increase calcium absorption in some cases increasing bioavailability up to 10%. Gonelli *et al.*, (2007) observed that absorption entailed 29% considering calcium enriched juices. Frontela *et al.* (2009) determined that the phytic acid content influenced calcium absorption with an observed variation from 0.66 to 13%. Other authors have suggested that the presence of some fatty acids could influence this process, such as stearic acid which reduces this mineral's absorption (Handerslev *et al.*, 2000). Cilla *et al.*, (2011) also determined that the samples' fat content affected calcium bioavailability. It remains an open possibility that the low bioavailability percentage of the enriched DFS was due to the samples' fat level.

Our results are in strong agreement with those described by those described by Mesías *et al.* (2009) who reported on a soluble calcium absorption range of 10-15% studying two different diets designed for teenagers. They are also close to those described by Van der Hee *et al.*, (2009). Abrams (2010) reported that not only the calcium source nor the dietary factors affect this mineral's absorption, in addition also the dietary intake, genetic factors and the Vitamin D status take on also important roles.

All of this variation caused by the aforementioned factors indicates that our results are grossly similar to those that have been described by other authors concerning calcium bioavailability. However, the DFS results obtained suggest a further necessity to undertake studies allowing confirming our hypothesis about the matrix influence and yielding more details about the technological characteristics of these salts.

CONCLUSIONS

Calcium lactate and calcium citrate-malate could be effectual for DFS enrichment with calcium at concentrations sufficient to achieve a 30% of the calcium RDA/100 g of

product. The technological and sensory properties remained acceptable at this concentration.

Bioavailability percentages encompassed close to 10% being inside of the average absorption limits established by other authors. Consequently, these DFS products could be considered as a new and healthy meat product suited to enhance the daily calcium intake.

REFERENCES

ABRAMS, S.A. 2010. Setting dietary reference intakes with the use of bioavailability data: calcium. *Am. J. Clin. Nutr.* 91 (suppl), 1474S-1477S.

ADLURI, R.S., ZHAN, L., BAGCHI, M., MAULIK, N. and MAULIK, G. 2010. Comparative effects of a novel plant-based calcium supplement with two common calcium salts on proliferation and mineralization in human osteoblast cells. *Mol. Cell. Biochem.* 340, 73-80.

AMMOR, M.S. and Mayo, B. 2007. Selection criteria for lactic acid bacteria to be used as functional starter cultures in dry sausage production: An update. *Meat Sci.* 76, 138-146.

AOAC 2011. *Official Methods of Analysis of AOAC International*. Association of Official Analytical Chemists. Washington D.C.

ARMENTEROS, M., ARISTOY, M., BARAT, J.M. and TOLDRÁ, F. 2012. Biochemical and sensory changes in dry-cured ham salted with partial replacements of NaCl by other chloride salts. *Meat Sci.* 90, 361-367.

ARTÉS, F., MÍNGUEZ, M.I. and HORNERO, D. 2002. Analysing changes in fruit pigments. In *Colour and food*, (D. B. MacDougall eds.) pp. 248-282, Woodhead Publishing in Food Science and Technology, Cornwall.

CÁCERES, E., GARCÍA, M.L. and SELGAS, M.D. 2006. Design of a new cooked meat sausage enriched with calcium. *Meat Sci.* 73, 368-377.

CALVO, M.M., GARCÍA, M.L. and SELGAS, M.D. 2008. Dry fermented sausages enriches with lycopene from tomato peel. *Meat Sci.* 8(2), 167-172.

CILLA, A., LAGARDA, M.J., ALEGRÍA, A., ANCOS, B., CANO, M.P., SÁNCHEZ, C., PLAZA, L. and BARBERÁ, R. 2001. Effect of processing and food matrix on calcium and phosphorous bioavailability from milk-based fruit beverages in Caco-2 cells. *Food Res. Int.* 44, 3030-3038.

- COMI, G., URSO, R., IACUMIN, L., RANTSIOU, K., CATTANEO, P., CANTONIE, C. and COCOLIN, L. 2005. Characterization of naturally fermented sausages produced in the north east of Italy. *Meat Sci.* 69, 381-392.
- CORPET, D.E. 2011. Red meat and colon cancer: should we become vegetarians, or can we make meat safer? *Meat Sci.* 89 (3), 310-316.
- COSTA, F.F. RESENDE, J.V. ABREU, L.R. and GOFF, H.D. 2008. Effect of calcium chloride addition on ice cream structure and quality. *J. Dairy Sci.* 916, 2165-2174.
- CHOI, Y.M., JUNG, K.C., JO, H.M., NAM, K.W., CHOE, J.H., RHEE M.S. and KIM, B.C. 2014. Combined effects of potassium lactate and calcium ascorbate as sodium chloride substitutes on the physicochemical and sensory characteristics of low-sodium frankfurter sausage. *Meat Sci.* 96, 21-25.
- DAENGPROK, W., GARNJANAGOONCHORNA, W. and MINE, Y. 2002. Fermented pork sausage fortified with commercial or hen eggshell calcium lactate. *Meat Sci.* 62, 199-204.
- DAMODARAN, S. 2008. Amino acids, peptides and proteins. In *Fennema Food Chemistry*. (S. Damodaran, K.L. Parkin and O.R. Fenemma, eds) pp. 217-329, CRC Press, Boca Ratón, Florida.
- DENDOUGUI, F. and SCHWEDT, G. 2004. In vitro analysis of binding capacities of calcium to phytic acid in different food samples. *Eur. Food Res. Technol.* 219, 409-415.
- EUROPEAN PARLIAMENT. Directive 2008/100/EC of the European Parliament. Official Journal of the European Union. L285/9-12. 29 October 2008.
- FERNÁNDEZ-GARCÍA, E.L., CARVAJAL-LÉRIDA, I. and PÉREZ-GÁLVEZ, A. 2009. In vitro bioavailability assessment as a prediction tool of nutritional efficiency. *Nutr. Res.* 29, 751-760.
- FERNÁNDEZ-LÓPEZ, J., VIUDA-MARTOS, M., SENDRA, E., SAYAS-BARBERÁ, E., NAVARRO, C. and PÉREZ-ALVAREZ, J. A.: Orange fibre as potential functional ingredient for dry-cured sausages. *Eur. Food Res. Technol.* 226, 1-6.
- FLORES, M., NIETO, P., FERRER, J.M. and FLORES, J. 2005. Effect of calcium chloride on the volatile pattern and sensory acceptance of dry-fermented sausages. *Eur. Food Res. Technol.* 221 (5), 624-630.
- FRONTELA, C., SCARINO, M.L., FERRUZZA, S., ROS, G. and MARTÍNEZ, C. 2009. Effect of dephytinization on bioavailability of iron, calcium and zinc from

- 1
2
3 infant cereals assessed in the Caco-2 cell model in infant formula. *World J.*
4 *Gastroenterol.* 15 (16), 1977-1984.
- 5
6 GALÁN, I., GARCÍA, M.L. SELGAS, M.D. 2011. Effects of ionizing irradiation on
7 quality and sensory attributes of ready-to-eat dry fermented sausages enriched with
8 folic acid. *Int. J. Food Sci. Technol.* 46, 469-477.
- 9
10
11 GUÉGEN, L. and POINTILLART, A. 2000. The bioavailability of dietary calcium. *J.*
12 *Am. Coll. Nutr.* 19(2), 119S-136 S.
- 13
14 GIMENO, O., ASTIASARAN, I. and BELLO, J. 2001. Calcium ascorbate as a potential
15 partial substitute for NaCl in dry fermented sausage: Effect on colour, texture and
16 hygienic quality at different concentration. *Meat Sci.* 57, 23–29.
- 17
18 GONELLI, S., CAMPAGNA, M.S., MONTAGANI, A., CAFFARELLI, C., CADRINI,
19 A., GIORGI, G. and NUTI, R. 2007. Calcium bioavailability from a new calcium-
20 fortified orange beverage, compared with milk, in healthy volunteers. *Int. J. Vit.*
21 *Nutr. Res.* 77 (4), 249-254.
- 22
23
24 GURBUZ, U. ARDIC, M. and CALIM, H.D. 2009. Microbiological characteristics of
25 Turkish Semi-Dry Fermented sausages during processing stages and storage. *J.*
26 *Anim. Vet. Adv.* 8 (4), 677-682.
- 27
28
29 HADERSLEV, K.V., JEPPESEN, P.B., MORTENSEN, P.B. and STAUN, M. 2000.
30 Absorption of calcium and magnesium in patients with intestinal resections treated
31 with medium chain fatty acids. *An. Int. J. Gastroenterol. Hepatol. (Gut)* 46, 819-
32 823.
- 33
34
35 HANSON, S. W. F. and OLLEY, J. 1963. Application of the Bligh and Dyer method of
36 lipid extraction to tissue homogenates. *Biochem. J.* 89, 101–102.
- 37
38
39 HEANY, R. P. WEAVER, C.M. and RECKER, R.R. 1988. Calcium absorbability from
40 spinach. *Am. J. Clin. Nutr.* 47, 707-709.
- 41
42
43 HERRERO, A.M., ORDÓÑEZ, J.A., ROMERO DE ÁVILA, M.D., HERRANZ, B.,
44 DE LA HOZ, L. and CAMBERO, M.I. 2007. Breaking strength of dry fermented
45 sausages and their correlation with texture profile analysis (TPA) and physico-
46 chemical characteristics. *Meat Sci.* 77, 331–338.
- 47
48
49
50
51 HUTKINS, R.W. 2006. Meat fermentation. In *Microbiology and Technology of*
52 *Fermented Foods*, (R.W. Hutkins, eds.) pp.207-232, Blackwell Publishing IFT
53 Press, Oxford.
- 54
55
56
57
58
59
60

- IKEM, A., NWANKWOALA, A., ODUEYUNGB, S., NYAVOR, K. and EGIEBOR, N. 2002. Levels of 26 elements in infant formula from USA, UK and Nigeria by microwave digestion and ICP-OES. *Food Chem.* 77 (4), 429-447.
- IOM. Institute of Medicine. 2010. Dietary Reference Intakes for Calcium and Vitamin D. Consensus Report. Food and Nutrition Board. November 30th.
- JAKOBSEN, M. and BERTELSEN, G. 2002. Modelling colour stability. In *Colour and food*. (D.B. MacDougall eds.) pp. 233-247. Woodhead Publishing in Food Science and Technology, Cornwall.
- KORSTANJE, R. and HOEK, M. 2001. Calcium and others minerals. In *Guide to functional food ingredients*, (J. Young, eds.) pp. 197-210, LFRA Ltd., Surrey.
- LAWLESS, H. T. RAPACKI, F. HORNE, J. and HAYES, A. 2003. The taste of calcium and magnesium salts and anionic modifications. *Food Qual. Pref.* 14 (4), 319-325.
- MARTÍN-DIANA, A.B., RICO, D., FRIAS, J.M., BARAT, J.M., HENEHAN, G.T.M. and BARRY-RYAN, C. 2007. Calcium for extending the shelf life of fresh whole and minimally processed fruits and vegetables: a review. *Trends Food. Sci. Tech.* 18 (4), 210-218.
- MEKMENE, O., LE GRAËT, Y. and GAUCHERON, F. 2009. A model for predicting salt equilibria in milk and mineral-enriched milks. *Food Chem.* 116, 233-239.
- MESÍAS, M., SEIQUER, I. and NAVARRO, M.P. 2009. Influence of diets rich in Maillard Reaction products on calcium bioavailability. Assays in male adolescents and in Caco-2 cells. *J. Agric. Food Chem.* 57, 9532-9538.
- MOSELEY, K. and JAN DE BEUR, S. 2010. Osteoporosis in men and women. In *Principles of Gender Specific Medicine*, (J. Marianne and M.D. Legato eds.) pp. 716-736. Elsevier, New York.
- NEILSON A.P. and FERRUZI M.G. 2013. Bioavailability and Metabolism of bioactive compounds from foods. In *Nutrition in the prevention and treatment of disease*, (A. Coulston, C. Boushey and M. Ferruzzi, eds) pp. 407-434, Elsevier, New York.
- NELSON, E., ROGERS, R.R., FRANTZ, J.A. and ZIEGLER, E.E. 1996. Palm olein in infant formula: absorption of fat and minerals by normal infants. *Am. J. Clin. Nutr.* 64, 291-296.
- ORDÓÑEZ, J.A., HIERRO, E.M., BRUNA, J.M. and DE LA HOZ, L. 1999. Changes in the components of dry fermented sausages during ripening. *Crit Rev Food Sci Nutr.* 39, 329-367.

1
2
3
4
5
6
7
8
9
10
11
12
13
14
15
16
17
18
19
20
21
22
23
24
25
26
27
28
29
30
31
32
33
34
35
36
37
38
39
40
41
42
43
44
45
46
47
48
49
50
51
52
53
54
55
56
57
58
59
60

PEACOCK, M. 2010. Calcium Metabolism in Health and Disease. Clin. J. Am. Soc. Nepr. 5, S23-S30.

PERALES, S., BARBERÁ, R., LAGARDA, M.J. and FARRÉ, R. 2005. Bioavailability of calcium from milk- based formulas and fruit juices containing milk and cereals estimated by in vitro methods (solubility, dializability and uptake and transport by Caco-2 cells). J. Agric. Food Chem. 53, 3721-3726.

PÉREZ-ÁLVAREZ, J.A., SAYAS-BARBERÁ, M.E., FERNÁNDEZ-LÓPEZ, J., GAGO-GAO, M.A., PAGÁN-MORENO, M.J. and ARANDA-CATALÁ, V. 1999. Chemical and color characteristics of Spanish dry-cured ham at the end of the aging process. J. Muscle Foods 10 (2), 195-201.

PÉREZ-ALVAREZ, J. A., SAYAS-BARBERÁ, M.E., FERNÁNDEZ-LÓPEZ, J. and ARANDA-CATALÁ, A. 1999. Physicochemical characteristics of spanish-type dry-cured sausage. Food Res. Int. 32, 599–607.

ISO. 1985. Sensory analysis. Methodology. General guidance (ISO-DP 6658). International Organization for Standarization.

NEWELL, G.J. and MACFARLANE, J.D. 1987. Expanded tables for multiple comparison procedures in the analysis of ranked data. J. Food Sci., 526 (6), 1721-1725.

REGULATION No 1907/2006 of the European Parliament and of the Council of 18 December 2006. Official Journal of the European Union L 396. December 30th.

SINGH, G., ARORA, S., SHARMA, G.S., SINDHU, J.S., KANSAL, V.K., and SANGWAN, R.B. 2009. Heat stability and calcium bioavailability of calcium-fortified milk. LWT-Food Sci. Technol. 40, 625–631.

SOTO, A.M., GARCÍA, M.L. and SELGAS, M.D. 2015. Bioavailability and technological properties of calcium salts in fresh meat products. It. J. Food Sci. 17 (1), 40-49.

SAVADKOOHI, S., HOOGENKAMP, H., SHAMSI, K. and FARAHNAKY, A. 2014. Color, sensory and textural attributes of beef frankfurter, beef ham and meat-free sausage containing tomato pomace. Meat Sci. 97, 410-418.

SCHULZ, E., ARFAI, K., LIU, X., SAYRE, J. and GILZANZ, V. 2004. Aortic calcification and the risk of osteoporosis and fractures. J. Clin. Endocrin. Metab. 89, 4246-4253.

SHIOWATANA, J., KITTHIKHUN, W., SOTTIMA, U., PROMCHAN, J. and KUNAJIRAPORN, K. 2006. Dynamic continuous-flow dialysis method to

- simulate intestinal digestion for in vitro estimation of mineral bioavailability of food. *Talanta* 68, 549-557.
- SITTIKULWITIT, A., SIRICHAKWAL, P.P., PUWASTIEN, P., CHAVASIT, V. and SHUNGPUAG, P. 2004. In vitro bioavailability of calcium from chicken bone extracts powder and its fortified products. *J. Food Comp. Anal.* 17 (3-4), 321-329.
- STOLLEWERK, K., JOFRÉ, A., COMAPOSADA, J., FERRINI, G. and GARRIGA, M. 2011. Ensuring food safety by an innovative fermented sausage manufacturing system. *Food Control*, 22 (12), 1984-1991.
- TEUCHER, B., MAJSAK-NEWMAN, G., DAINITY, J.R., MCDONAGH, D., FITZGERALD, R.J. and FAIRWEATHER-TAI, S.J. 2006. Calcium absorption is not increased by caseino-phosphopeptides. *Am. J. Clin. Nutr.* 84, 162-166.
- TOLDRÁ, F. and REIG, M. 2011. Innovations for healthier processed products. *Trends Food Sci Technol.* 22, 517-522.
- UEDA, Y. and TAIRA, X. 2013. Effect of anions or foods on absolute bioavailability of calcium from calcium salts in mice by pharmacokinetics. *J. Exp Pharmacol.* 3 (5), 65-71.
- VAN DER HEER, M.M., MIRET, S., SLETTENAAR, M., DUCHATEAU, S.M.J.G., RIETVELD, A.G., WILKINSON, J.E., QUAIL, P.J., BERRY, M.J., DAINITY, J.R., TEUCHER, B. and FAIRWEATHER-TAIT, S.J. 2009. Calcium absorption from fortified ice cream formulations compared with calcium absorption from milk. *J. Am. Diet. Assoc.* 109, 830-835.
- WEAVER, MC. 1998. Calcium in food fortification strategies. *Int. Dairy J.* 8, 443-449.
- YANG, H.S., CHOI, S.G., JEON, J.T., PARK, G-B. and JOO, S-T. 2007. Textural and sensory properties of low fat pork sausages with added hydrated oatmeal and tofu as texture-modifying agents. *Meat Sci.* 75, 283-289.
- ZHANG, W., XIAO, S., SAMARAWEEERA, H., LEE, E.J. and AHN, D.U. 2010. Improving functional values of meat products. *Meat Sci.* 86, 15-31.

1
2
3
4
5
6
7
8
9
10
11
12
13
14
15
16
17
18
19
20
21
22
23
24
25
26
27
28
29
30
31
32
33
34
35
36
37
38
39
40
41
42
43
44
45
46
47
48
49
50
51
52
53
54
55
56
57
58
59
60

ACKNOWLEDGMENTS

This work was financed by the national project CONSOLIDER-Ingenio 2010 (Ref. CSD2007-00016) and the Research Group BSCH-UCM No. 920276 (Ref. GR35/10A) of the Complutense University.

For Peer Review

Table 1. Calcium salt amounts added to dry fermented sausages to provide 20, 30 or 40% of the RDA

Batches	g/100g product
CG20	1.12
CG30	1.68
CG40	2.23
CL20	0.77
CL30	1.15
CL40	1.54
CCM20	0.23
CCM30	0.35
CCM40	0.47

Figure 1: Microbial count evolution of the CL30 enriched sausages through the ripening period.

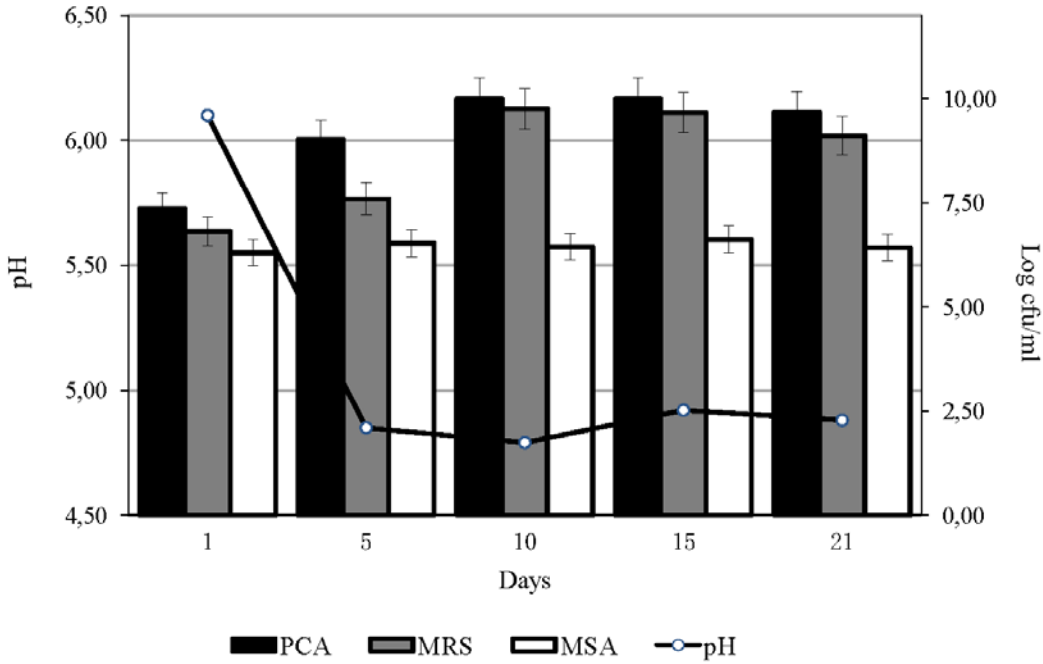


Table 2. Effect of the calcium salts on the colour parameters of experimental dry fermented sausages

Batches	L*	a*	b*	Hue Angle	Saturation Index	ΔE
Control	57.95±2.30 ^b	9.64±1.08 ^{bc}	9.86±0.92 ^{bc}	45.89±1.68 ^b	13.92±1.36 ^b	
CG20	60.66±3.80 ^a	8.90±1.88 ^c	10.04±2.18 ^{bc}	48.44±6.36 ^a	13.64±2.26 ^b	3.03±0.47 ^c
CG30	59.85±8.25 ^{ab}	10.22±3.38 ^b	9.15±2.21 ^c	41.82±5.48 ^c	14.22±3.70 ^{ab}	2.11±1.07 ^c
CG40	57.40±6.76 ^b	11.30±3.76 ^{ab}	9.84±1.94 ^{bc}	41.02±6.21 ^c	15.51±3.89 ^{ab}	1.75±0.89 ^d
CL20	58.45±4.11 ^b	10.85±2.10 ^b	10.97±1.86 ^{bc}	45.55±3.85 ^b	15.59±2.60 ^{ab}	1.72±0.54 ^d
CL30	57.03±3.15 ^b	13.08±1.27 ^a	13.53±1.75 ^a	46.13±3.45 ^b	18.97±1.96 ^a	5.11±0.42 ^{bc}
CL40	57.84±4.36 ^b	12.14±2.31 ^a	12.30±2.14 ^{ab}	45.59±5.35 ^b	17.46±2.79 ^a	3.5±0.57 ^c
CCM20	52.68±5.57 ^{bc}	10.47±1.98 ^b	13.32±1.79 ^a	51.78±5.18 ^a	17.18±2.30 ^a	6.36±0.77 ^b
CCM30	54.60±4.93 ^c	11.75±2.09 ^{ab}	12.50±2.93 ^{ab}	46.77±6.51 ^{ab}	17.36±3.13 ^a	4.87±0.71 ^a
CCM40	54.61±4.43 ^{bc}	10.36±2.03 ^b	12.15±1.37 ^{ab}	49.54±3.88 ^a	16.16±2.27 ^{ab}	4.11±0.60 ^c

Values in column with common lower case letters are not different ($p>0.05$) between batches of the DFS

L*: lightness (0-100); a*: redness (-60.+60); b*: yellowness (-60.+60)

Hue Angle: $\tan^{-1}(b^*/a^*)$

Saturación Index: $(a^{*2} + b^{*2})^{0.5}$

$\Delta E = (\Delta L^{*2} + \Delta a^{*2} + \Delta b^{*2})^{1/2}$

Table 3. Effect of the calcium salts on the textural parameters (TPA) of experimental dry fermented sausages

Batches	Hardness (N)	Adhesiveness (Ns)	Springiness (cm)	Cohesiveness (ratio)	Gumminess (Ncm)	Chewiness (Ns)
Control	70.48±3.38 ^b	-0.89±0.16 ^c	0.35±0.01 ^{ab}	0.53±0.02 ^a	37.35±1.90 ^a	13.07±0.91 ^{ab}
CG20	71.09±4.85 ^b	-2.05±0.58 ^a	0.37±0.02 ^{ab}	0.32±0.06 ^c	22.74±1.39 ^{bc}	8.41±0.20 ^d
CG30	65.14±10.13 ^{bc}	-1.23±0.70 ^{ab}	0.37±0.02 ^{ab}	0.58±0.05 ^a	37.78±7.84 ^a	13.97±3.51 ^{ab}
CG40	58.48±4.77 ^d	-0.84±0.39 ^c	0.34±0.04 ^{ab}	0.57±0.06 ^a	33.33±8.40 ^a	11.33±3.82 ^b
CL20	61.36±8.98 ^{bc}	-0.94±0.15 ^c	0.35±0.08 ^{ab}	0.41±0.05 ^{bc}	25.15±3.44 ^{ab}	8.80±2.80 ^c
CL30	64.62±11.00 ^{bc}	-1.07±0.60 ^b	0.37±0.02 ^{ab}	0.56±0.06 ^a	37.47±8.50 ^a	13.86±3.80 ^{ab}
CL40	52.42±3.32 ^{bc}	-0.63±0.08 ^c	0.44±0.02 ^a	0.33±0.04 ^c	17.29±2.56 ^d	7.61±0.61 ^c
CCM20	83.40±11.27 ^{ab}	-1.22±0.55 ^{ab}	0.32±0.03 ^b	0.50±0.13 ^{ab}	41.70±5.22 ^a	13.34±2.43 ^{ab}
CCM30	88.64±8.46 ^a	-1.18±0.48 ^b	0.43±0.05 ^a	0.53±0.02 ^a	46.97±4.83 ^a	20.20±2.02 ^a
CCM40	71.18±11.27 ^b	-1.92±0.39 ^{ab}	0.44±0.08 ^a	0.56±0.06 ^a	39.86±6.70 ^a	17.53±3.79 ^a

Data are the means ± S.D.

Values in column with common lower case letters are not different (p>0.05)

Table 4. Effect of the calcium salts on the sensory properties and the overall acceptability of experimental dry fermented sausages

Batches	Odour	Colour	Taste	Texture	Overall acceptability
Control	6.96±1.18 ^{ab}	6.27±1.11 ^a	5.72±0.84 ^{ab}	5.85±1.23 ^{ab}	5.93±0.77 ^{ab}
CG20	7.97±1.00 ^a	4.31±1.41 ^c	4.06±1.23 ^b	4.26±1.46 ^b	4.94±1.48 ^c
CG30	6.26±0.73 ^{ab}	5.69±0.65 ^b	3.69±0.80 ^c	5.07±0.96 ^{ab}	5.34±0.76 ^{bc}
CG40	6.59±0.62 ^{ab}	5.46±0.55 ^b	4.76±1.08 ^b	3.97±0.79 ^c	5.04±0.80 ^{bc}
CL20	7.21±0.73 ^{ab}	6.89±1.16 ^a	6.37±1.96 ^a	6.21±1.35 ^a	6.26±1.22 ^a
CL30	6.69±1.53 ^{ab}	7.09±1.53 ^a	5.85±1.94 ^{ab}	6.89±1.02 ^a	6.56±2.06 ^a
CL40	6.89±0.90 ^{ab}	6.68±1.42 ^a	5.66±1.07 ^{ab}	5.23±1.04 ^{ab}	5.41±0.66 ^{bc}
CCM20	5.93±1.80 ^b	5.53±2.08 ^{ab}	5.48±0.70 ^{ab}	5.69±1.85 ^{ab}	5.91±1.22 ^{ab}
CCM30	6.15±1.13 ^{ab}	6.79±0.94 ^a	6.51±1.47 ^a	6.16±2.17 ^a	6.70±1.21 ^a
CCM40	6.25±1.46 ^{ab}	5.59±1.89 ^{ab}	5.08±1.30 ^{ab}	5.58±1.27 ^{ab}	5.81±1.15 ^{ab}

Data are the means ± S.D.

Values in column with common lower case letters are not different (p>0.05)

Figure 2: Principal Component Analysis: Description of the main variations at the hedonic test of the dry fermented sausages.

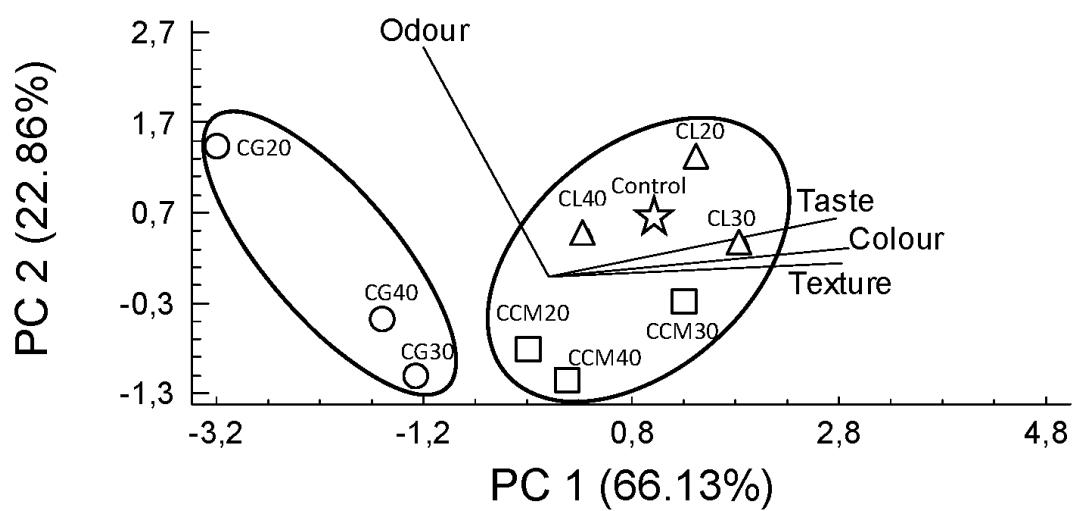


Table 5. Calcium content (mg Ca/ 100 g DFS) in the different phases of the *in vitro* digestion and calcium bioavailability (%) from the experimental dry fermented sausages

Calcium salt	Sample	Gastric Phase Ca	Non Dialyzed Ca	Dialyzed Ca	Bioavailability (%)
CL30	281.52±36.52	98.55±31.46	12.94±0.50	29.68±9.45	10,54
CCM30	290.19±72.99	94.26±33.15	11.10±3.90	27.47±9.66	9.47

Data are the means S.D.

Bioavailability (%) = [Dialyzed Ca/ Ca sample]*100

4.5. Bioavailability of calcium from enriched meat products using Caco-2 cells.

Food Research International (2014), vol 5: 263-270



Bioavailability of calcium from enriched meat products using Caco-2 cells



A.M. Soto, P. Morales, A.I. Haza, M.L. García, M.D. Selgas *

Department of Nutrición, Bromatología y Tecnología de los Alimentos, Faculty of Veterinary, Complutense University, 28040 Madrid, Spain

ARTICLE INFO

Article history:

Received 24 July 2013

Accepted 23 October 2013

Keywords:

Meat products

Calcium bioavailability

Caco-2 cells

ABSTRACT

Calcium bioavailability from enriched meat products has been studied by an *in vitro* gastrointestinal digestion followed by an assay with a Caco-2 cells culture. The calcium salts used were calcium citrate malate and calcium lactate; both salts were previously assayed in fresh, cooked and dry fermented meat products with good technological and sensory results. They were added in sufficient amounts so that a portion contains 30–40% of the calcium Recommended Dietary Allowance (RDA). The major losses of calcium take place at intestinal level and seem to be related to the food matrix composition and the form in which the calcium is found linked. Regardless the type of calcium salt added, the percentage of calcium transported across the Caco-2 monolayer was similar in fresh meat product, bologna sausages and in the milk used as control. Therefore, these meat products could be considered as source of calcium bioavailable in a habitual diet. In the dry fermented sausages, the percentage of calcium transported was significantly lower.

© 2013 Elsevier Ltd. All rights reserved.

1. Introduction

Calcium (Ca) is one of the most important minerals for the human body. It is an essential structural component in bones and teeth and takes part in a variety of biochemical and physiological processes: neuromuscular excitability, blood coagulation, transfer of inorganic ions across membranes, hormone secretion or release of cellular enzymes and signal transductions (Adluri, Zhan, Bagchi, Maulik, & Maulik, 2010; Brodaus, 1996; Heany et al., 2000; Miller, Jarvis, & McBean, 2001; Prince, Devine, Dhaliwal, & Dick, 2006; Sittikulwitit, Sirichakwal, Puwastien, Chavasit, & Shungpuag, 2004; Straub, 2007).

Calcium deficiency is associated to the development of diseases, mainly osteoporosis, osteopenia and arterial hypertension (Adluri et al., 2010; Moseley & de Beur, 2011). This deficiency could be controlled by a calcium intake in order to maintain the adequate calcium level. Different health organizations worldwide recommend different intakes based on calcium balance studies, data on bone mineral content and changes in bone mineral density (Straub, 2007). Thus, the European Parliament recommends 800 mg per day for adults of any age (European Parliament, 2008/100/EC), while the Institute of Medicine of the United States indicates that the amount should be 1000 mg for adults aged 19 to 50 years old (Institute of Medicine (IOM), 2010).

For several decades, researchers and the food industry have made many efforts and large investments to develop new healthy and more nutritious foods. One of the strategies developed is the incorporation of bioactive compounds whose physiological activity contributes to the improvement of health (Fernández-García, Carvajal-Lérída, & Pérez-Gálvez, 2009). Such is the case of the calcium.

It is well known that the milk and milk products provide much of the calcium in the human diet. Green leafy vegetables and fish can provide this mineral too, but the presence of other bioactive compounds in vegetables such as dietary fiber, phytate and oxalate have negative effects on the calcium bioavailability (Charoenkiatkiu, Kriengsinyos, Tuntipopipat, Suthutvoravut, & Weaver, 2008; Heany et al., 2000; Kamchan, Puwastien, Sirichakwal, & Kongkachuichai, 2004).

Several calcium sources have been tested for the enrichment of foods, the main ones being liquid and powder milk (Moreiras, Carbajal, Cabrera, & Cuadrado, 2003; Sittikulwitit et al., 2004), egg shell calcium (Daengprok, Garnjanagoonchorn, & Mine, 2002) and calcium salts such as calcium phosphate, citrate (Mekmene, Le Graët, & Gaucheron, 2009), carbonate (Van der Hee et al., 2009), cholate (Costa, Resende, Abreu, & Goff, 2008; Singh et al., 2007), calcium lactate (Cáceres, García, & Selgas, 2006; Daengprok et al., 2002) and, more recently, citrate–malate (Soto, Morales, Haza, García, & Selgas, 2012).

The development of functional foods enriched with bioactive compounds is a two-fold aim: to know the final characteristics of the enriched food and to know the calcium bioavailability. Initially, there was no consensus between the US and European legislations and the bioaccessibility determination was not a priority goal for the functional foods design. However, the situation has now changed and bioaccessibility studies are now essential to know if a bioactive compound is available for absorption from the food as well as its bioactivity, i.e., the assimilation by the target tissue (Benito & Miller, 1998; Fernández-García et al., 2009; Neilson & Ferruzzi, 2013). Bioaccessibility studies include knowing the behavior of the bioactive compound during the sequence of events which take place in the digestion process in order to the transformation of the food into material that can be assimilated by the body and transported through the cells of the intestinal epithelium. There are different experimental techniques developed for this purpose,

* Corresponding author. Tel.: +34 91 3943745; fax: +34 91 3943743.

E-mail address: selgar@vet.ucm.es (M.D. Selgas).

but the experimental procedures are not standardized (Vaisberg, Lenzi, Hansen, Keon, & Finer, 2006). One of these techniques is the use of cell cultures that simulate the absorption of calcium in the intestinal epithelium: the case of the Caco-2 cells widely used.

Caco-2 cells are a continuous line of heterogeneous human epithelial colorectal adenocarcinoma developed by the Sloan-Kettering Institute for Cancer Research (Fossati et al., 2008; Smetanová, Stetinová, Svoboda, & Kvetina, 2011). Certainly, they have a cancerous origin, but these cells show a good ability to initiate spontaneous differentiation on reaching confluence under normal culture conditions (i.e., in presence of glucose and serum). This capacity makes that, over a period of 20 to 30 days of culture, the cells start to show a morphological polarity and levels of brush border hydrolases. Both characteristics are comparable with those of mature intestinal absorptive cells. Apart from express border enzymes, these cells can also show growth factor receptors and major drug-metabolizing enzyme (Hidalgo, Raub, & Borchardt, 1989; Le Ferrec et al., 2001; Smetanová et al., 2011).

Our research group has successfully developed meat products (hamburgers, cooked sausages and dry-fermented sausages) enriched with calcium by incorporating calcium lactate and calcium citrate malate, two calcium salts so far untested in this kind of food (Cáceres et al., 2006; Selgas, Salazar, & García, 2009; Soto, Carrión, García, & Selgas, 2010). These salts show high percentage of absorption (Korstanje & Hoek, 2001; Straub, 2007) and are permitted in foods since 2006 (European Parliament, 1907/2006). As a result of incorporating the salts in sufficient amount so that a portion of each product gives up to 30–40% of the Recommended Dietary Allowance (RDA) (1000 mg Ca, IOM, 2010) (Soto, Carrión, García, & Selgas, 2010; Soto et al., 2012), meat products with good technological and sensory qualities have been obtained.

The objective of this work was to study the calcium bioaccessibility from these designed enriched meat products. For this purpose, a simulated gastrointestinal digestion has been developed by an *in vitro* study using the salts, the enzymes and the conditions that imitate the physiological phases prevailing during the process. The bioaccessibility has been studied using Caco-2 cells to simulate the passage through the intestinal cell membrane.

2. Material and methods

2.1. Meat products manufactured

Meat products (hamburger cooked and dry fermented sausages) were manufactured following the traditional formula used in the meat industry (Cáceres et al., 2006; Galán, García, & Selgas, 2010; Selgas et al., 2009). The meat was acquired in a local abattoir. The mixture of spices and additives (Procavi® and Curavi®) for sausages was provided by Anvisa (Arganda del Rey, Madrid, Spain); calcium lactate (CL) by Panreac (Castellar del Vallés, Spain) and calcium citrate malate (CCM) by Jost Chemical Co. Europe (Andenne, Belgium).

Hamburgers were prepared with 1.87 g CCM/100 g, amount that contributes to 40% of the calcium Recommended Dietary Allowance (RDA) (1000 mg, IOM, 2010). This was the maximum amount that presented good sensory characteristics (Soto, Galán, Gámez, García, & Selgas, 2010). Calcium lactate was not added at 40% because the required amount gave the meat a whiteness appearance very different from what was expected. For that reason, hamburgers were enriched with CL at 30% of the RDA, which means a quantity of 2.31 g/100 g.

In the case of cooked sausages, the maximum concentrations which gave the best technological and sensory results were 1.40 g CCM/100 g and 2.31 g CL/100 g. These amounts allowed us to achieve 30% of the RDA. In the dry fermented sausages the loss of water occurring during ripening (close to 50%) was taking into account and the calcium salts amount added was half of that added to cooked sausages (Cáceres et al., 2006; Selgas et al., 2009; Soto, Carrión, García, & Selgas, 2010).

These calculations were made on basis to the purity of the calcium salts, which was >98%, based on the anhydrous formula.

For the hamburgers manufacture, the meat was grounded (Grinder C10; Falsf Co., Spain) and calcium salts were distributed into the meat using a mixer (Mainca, Barcelona, Spain). They were molded into plates of 10 cm diameter/1 cm high. They were cooked on an electric grill (180 °C, 2 min on each side), sufficient time to achieve a temperature of 80 °C in the center of the hamburger (Tornberg, 2005). The temperature was controlled using a digital thermometer (Testo mod. 735, Barcelona, Spain).

For the cooked sausages manufacture, the lean and fat meats were chopped in a cutter (Robot Coupe, Jackson Mod 20v, MS, USA) (15,000 rpm). The calcium salts were mixed with the spices and additives (Procavi®) and added to the batters maintaining a temperature <2 °C. The sausages were stuffed into 80 mm diameter artificial casings (Betex-Pack, Belgium) and cooked in a steam oven (78 °C–35 min), sufficient time to achieve 72 °C in the center of the sausages. Then, they were cooled and kept at 4 °C for further analysis.

For the dry fermented sausages manufacture, the lean meat and fat back were chopped in the Grinder C10; the calcium salts were also added previously mixed with the spices and additives (Curavi®). Artificial casings (50 mm diameter) (Betex-Pack, Belgium) were used for stuffing and the ripening was carried out in a ripening cabinet (Binder mod. KBF 115 Tilingen, Germany) programmed in accordance with the following conditions: 48 h at 22 °C and 92% RH and 20 days at 12 °C/85% RH.

The manufacture of every product was carried out in duplicate.

2.2. *In vitro* gastrointestinal digestion

The human gastrointestinal digestion was simulated using a static *in vitro* method (Shiowatana, Kitthikhun, Sottima, Promchan, & Kunajiraporn, 2006). Samples of meat products (10 g) or 10 ml of UHT milk used as Control were homogenized (Polytron® SEV-gepüft., Littau-Luzerne, Switzerland) with 50 ml of 0.2 M phosphate buffer. The pH was adjusted to 2.0 with 5 N HCl (Charman, Porter, Mithani, & Dressman, 1997). To simulate the gastric phase (GP), 0.33 ml of suspension of pepsin (16 g pepsin EC 232-629-3/100 ml 0.1 N HCl) was added. The samples were incubated in a shaker (Thermo Scientific MaxQ4000, Iowa, USA) at 130 rpm, 37 ± 0.5 °C for 2 h.

To simulate the intestinal phase (IP), 20 g of the gastric digest was mixed with 5 ml of pancreatic–bile conjugate [0.2 g pancreatic from porcine pancreas (EC 232-468-9) and 1.25 g porcine bile extract (EC 232-369-0) in 50 ml 1 M NaHCO₃]. The pH was adjusted to 7–7.5 with 2 M NaHCO₃, to achieve the pH of the duodenal tract (Oomen et al., 2003) and volume used was recorded for following step.

Other 20-g aliquots of the gastric digest were added to 25 ml of distilled water, 5 ml of pancreatic–bile conjugate and the volume determined before of 2 M NaHCO₃. The mix was incubated at 130 rpm, 37 ± 0.5 °C for 2 h. After that, the digest was maintained for 10 min in ice in order to stop the enzyme reaction.

Aliquots of 25 g of the digest were transferred to polypropylene tubes (50 ml) (Costar, New York, USA) and centrifuged at 3500 g for 1 h at 4 °C (Sorvall, Mod. RC 5B., Schwerte, Germany). Two phases were obtained; the supernatant phase, corresponding to the soluble fraction or available fraction, and the pellet phase, the solid residue containing the calcium that would be eliminated (solid delivery). Both phases were separated and the calcium content was determined.

All enzymes were from Sigma-Aldrich (Steinheim, Germany) and the reactive was from Panreac (Barcelona, Spain). The UHT milk, used as control, was acquired in the market.

2.3. Caco-2 method

The kit CacoReady™ (2010, Advancell®, Barcelona, Spain) was used. This kit provides 21 day cell barrier integrated in 24 HTS transwell

plates with a shipping medium stable at room temperature. The transwell have two chambers: the apical chamber, which simulates the intestinal lumen, and the basal chamber, which would collect the bioavailable calcium.

At the reception, the plates were kept at 37 °C in an atmosphere of 95% RH/5% CO₂ for 4 h and the liquefied shipping medium was replaced twice and aspirated from both chambers. The apical and basolateral surfaces of the monolayer were washed three times with Hank's Balanced Salt Solution (HBSS) buffer with calcium and magnesium (Invitrogen, Life Technologies S.A., Alcobendas, Spain). Then, 300 µl of Dulbecco's Minimum Essential Medium (DMEM) Caco-2 medium culture, previously warmed at 37 °C, was added to each chamber. The composition of such culture medium was as follows: 1 g/l glucose, 10% fetal bovine serum, 1% glutamine 200 mM, 1% penicillin (10,000 U/ml) and streptomycin (10 mM/ml), pH 7.

The digest was diluted with HBSS buffer in order to achieve Ca final concentrations of 10 (data not shown), 20 and 40 µM. Then, it was added to the apical region of the transwell and they were incubated for 90 min at 37 °C under 5% CO₂, 95% of RH. After incubation, the apical compartment was aspirated and the basal chamber solution was recovered for the determination of the calcium transported across the monolayer (bioaccessible calcium). The solution was frozen (−20 °C) for further analysis. HBSS buffer was used as negative control (blank) and commercial whole calcium milk as positive control. The process was performed in a bio-safety cabinet Telstar Bio-II-A (number: 9550) (Terrassa, Spain).

2.4. Evaluation of the monolayer integrity using transepithelial electrical resistance (TEER)

Transepithelial electrical resistance values were measured in order to determinate the toxicity of the different Ca concentration of the digests added against to the Caco-2 cell monolayer. A Millicell® ERS-2 volt ohmmeter (Millipore Corporation, Billerica, U.S.A., 2009) was used to make measurements and the TEER was expressed in ohms per cm² (Ωcm²). The active membrane surface was 0.33 cm².

The electrodes were sterilized by immersion in ethanol (70%) for 30 min. The equilibration was done for 20 min in Caco-2 medium, previously warmed at room temperature. Then, they were inserted into the transwell system. The thinner electrode was placed within the narrowest slit (basal chamber) and the thicker electrode was placed inside the widest slit (apical chamber). According to the instructions of the CacoReady™ kit (<http://www.cacoready.com/>), a TEER value greater than 1000 Ωcm² indicates the confluence of the cells, the integrity of monolayer and the formation of a semipermeable layer adequate for the test, meaning that the barrier system is acceptable for a nutrient absorption assay. Lower TEER values appear to be associated to a certain degree of cytotoxicity.

2.5. Apparent permeability coefficient (Papp) determination

The apparent permeability to the calcium (Papp in cm/s) (the correlation between the absorption of a component across Caco-2 cells and the human intestinal absorption) was calculated according to the following formula (Artursson, 1990; Irvine et al., 1999):

$$Papp = [dQ / (dt \times A \times C_0)]$$

where dQ / dt is the amount of product present in the basal compartment in function of time (nmol/s); A is the area of transwell (0.33 cm²) and C₀ is the initial concentration of product applied in apical compartment (nmol/ml).

Based in *in vitro/in vivo* correlation studies (CacoReady™, 2010) (Advancell®, Barcelona, Spain), if the Papp is lower than 10^{−6} cm/s, the range of predicted *in vivo* absorption is low (0–20%); if it ranges between 10^{−6} and 10 × 10^{−6}, the absorption is medium (20–70%) and if

it is higher than 10 × 10^{−6}, there is a high absorption (70–100%). The Papp was also determined in the control transport buffer and it was subtracted to the calcium amount determined in the basal compartment of the samples.

2.6. Calcium determination

Calcium was determined in the meat products, in the positive control milk, in the digested samples (GP and IP) and in the samples removed from the basal chamber. Calcium determination was conducted in triplicate for each sample according to the procedure described by Perales, Barberá, Lagarda, and Farré, (2005) using atomic absorption spectroscopy (AAS). Aliquots of the samples were reduced to ashes at 600 °C for 2 to 3 days in a muffle furnace. The inorganic residues were dissolved in 1 M HCl. In order to suppress phosphate interferences, further dilutions were made with LaCl₃ (0.5 M HCl containing 0.5% lanthanum), in sufficient amount to yield a lanthanum final content of 0.2%. The determination of the total calcium was performed by atomic absorption spectrophotometry (AAS, 5100 PC, Perkin Elmer, Norwalk, CT) at 422.7 nm. The calibration curves were performed with standard solutions containing 1–14 µg/ml of CaCl in 6.5% HCl (Cilla et al., 2011). Skim milk powder CRM 063R (Sigma-Aldrich, Steinheim, Germany) was used as material of reference.

2.7. Calcium availability and bioaccessibility

Calcium content in different stages was expressed as mg/100 g product and it was calculated as follows:

Calcium in the gastric phase:

$$\%Ca \text{ in GP} = [Ca \text{ determined in Gastric Phase} / Ca \text{ in the product}] \times 100.$$

Calcium available: Ca determined in the supernatant fraction obtained after the centrifugation of the intestinal phase. It corresponds to the calcium that is released from its matrix in the gastrointestinal tract and becomes available for absorption after the digestion process:

$$\%Ca \text{ Available} = [Ca \text{ soluble in the Intestinal Phase} / Ca \text{ in the product}] \times 100.$$

Transport percentage is the quantity of calcium (%) that crosses the membrane cell:

$$\text{Transport percentage (\%)} = [T / C_0] \times 100$$

where:

T (transport efficiency) = difference between calcium amount in the basal chamber and transport buffer (blank) and

C₀ = total calcium content of the sample in the apical chamber.

2.8. Statistical analysis

Results were statistically analyzed by two-way ANOVA in which factors were represented by the type of calcium salt and the type of product. The food matrix effect was analyzed by a one-way ANOVA in which the independent factor was the calcium salt and the dependent factor was the type of meat product. The significance level was established at P < 0.05. Statistical analyses were performed using the Statgraphics Centurion XVI.I (Statistical Graphics Corporation, Herndon, VA, USA).

3. Results and discussion

Before beginning the test with the Caco-2 cells, the higher Ca concentration that was not toxic for the cells was studied. For that, the

diluted intestinal digests (20 and 40 μM) were inoculated into the wells. After incubation (90 min), TEER values were measured to establish the integrity of the monolayer: the higher resistance between the apical and the basolateral compartments, the higher polarization the Caco-2 cells have. The high TEER values indicate the confluence of the cells and the formation of a semipermeable layer adequate for the test, while the low values appear associated to a certain degree of cytotoxicity (Frontela, Scarino, Ferruzza, Ros, & Martínez, 2009; Lu, Gough, Bobrowski, & Stewart, 1996). Fig. 1 shows the results obtained.

Although the TEER slightly decreased with the increase of calcium concentration and incubation time, no significant differences were obtained from 0 min to 90 min in any meat product and the values were

in all cases higher than 1000 Ωcm^2 . Similar behavior was observed in positive control milk: at time 0, TEER values were 2200 ± 990 , 2000 ± 131 and $1900 \pm 530 \Omega\text{cm}^2$ for concentrations of 0, 20 and 40 μM , respectively, and after 90 min, 2200 ± 990 , 1800 ± 297 and $1900 \pm 990 \Omega\text{cm}^2$ were determined at the same concentrations (data not shown).

Different values of TEERS have been reported as acceptable. Mehran et al. (1997), Tallkvist, Bowlus, and Lönnardal (2000), El-Sayed, Ginski, Rhodes, and Ghandehari (2002) and Viadel, Barberá, and Farré (2006) described values between 180 and 1000 Ωcm^2 . While other authors reported that TEER values lower than 250 Ωcm^2 suggest a cytotoxicity, Mesías, Seiquer, and Navarro (2009) and Frontela et al. (2009) described that 500 Ωcm^2 could be considered the acceptable limit.

In our case, the CacoReady™ kit instructions indicate that a value higher than 1000 Ωcm^2 corresponds to a good cell integrity. Since our data was higher than this value, it was considered that any of the concentration assayed could be used for the tests. For this reason, and in order to facilitate the study, the highest concentration assayed (40 μM) was selected for further analysis.

Table 1 shows the calcium content in the control milk, in the manufactured meat products and in the gastric and intestinal phases. In the control milk, the calcium content was $122.60 \pm 14.76 \text{ mg}/100 \text{ g}$, the usual for this type of product. The Ca content in the meat products was expected by the calcium salt amount added and so, in the batches enriched with the 30% of the RDA the Ca content ranged between 301.43 and 336.29 $\text{mg}/100 \text{ g}$, and in the batches enriched with the 40% RDA, the Ca content was 418.51 $\text{mg}/100 \text{ g}$.

In the GP, the calcium percentage changed according to the food. So, in hamburgers the practical totality of the calcium added, 96.9% and 97.4% in CCM and CL batches, respectively was recovered; in bologna sausages only half was recovered, 56.11% and 56.09% in CCM and CL batches, and in the dry fermented sausages, the third part, 34.70% and 34.86% for the same salts, respectively. In the milk sample, the GP contained the 75.25% of the calcium detected.

The calcium available or calcium present in the supernatant (soluble fraction) of the IP, showed the same behavior. The liberation of calcium from hamburgers is the highest since the Ca available was close to the 39% of the calcium content in the product. This value is followed by those of milk (23.19%) and bologna sausages. Therefore, it could be said that the Ca available achieves an average value of 21% (27.70% in CCM30 batch and 16.77% in the CL30 batch). The highest differences were observed in dry fermented sausages in which the Ca available decreased to values under 10% of the content in the original product (9.62 and 9.31% for CCM30 and CL30, respectively).

These results indicate that the major losses take place at intestinal level and seem to be related to the matrix composition and the form in which the calcium is found linked in the food. Both factors can affect the calcium availability as indicated by Jovaní, Barberá, and Farré (2001) and Cámara-Martos and Amaro-López (2002).

Although Sheikh, Santa Ana, Nicar, Schiller, and Fordtran (1987) established that the food matrix scarcely affects the mineral absorption, the most acceptable tendency is that the calcium absorption is compromised by the presence of some factors. So, Aarle, Bontenbal, and Potjewijd (1997) reported that food matrix affects the calcium absorption as much as the mineral source used for the enrichment. Guéguen and Pointillart (2000) described the negative influence of several factors like fat, phytates, tannins, oxalates content as well as an excess of proteins. Hartmann and Meisel (2002) and Roig, Alegria, Barberá, Farré, and Lagarda (1999) reported the positive effect of milk proteins and mainly caseins on the bioavailability of calcium. The digestion of caseins yields phosphopeptides that inhibit the phosphate precipitation in the intestinal lumen and permits that the calcium is kept in soluble form available for absorption. Phytates are one of the most important inhibitors of calcium absorption and so, Frontela et al. (2009), studying infantile meals added with cereals, observed a significant increase of the calcium uptake after removing phytates.

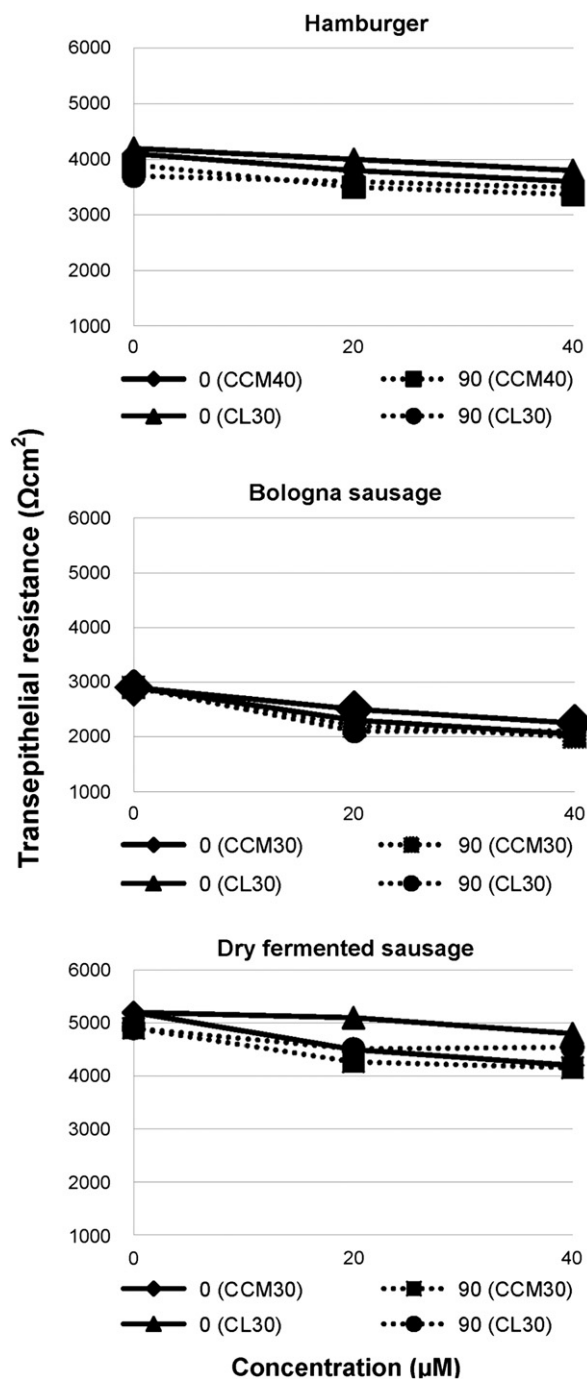


Fig. 1. Transepithelial resistance values (Ωcm^2) of the monolayer of Caco-2 cells after incubation of the intestinal digests obtained from the enriched meat products and diluted to achieve different calcium concentrations.

Table 1

Calcium content (mg/100 g product) in the milk and the enriched meat products and in the gastric (GP) and intestinal (IP) phases obtained after the digestion process.

Calcium salt	Sample	Ca product	GP		IP	
			Ca determined	% Ca in GP	Ca soluble	% Ca available
	Milk	122.60 ± 14.76 ^c	92.26 ± 9.48 ^d	75.25 ± 0.64 ^b	28.43 ± 0.29 ^e	23.19 ± 0.02 ^b
CCM40	Hamburger	418.51 ± 36.66 ^a	405.38 ± 30.95 ^{aA}	96.90 ± 0.84 ^{aA}	164.17 ± 13.57 ^{aA}	39.22 ± 0.37 ^{aA}
CCM30	Bologna sausage	317.64 ± 28.03 ^b	183.85 ± 13.65 ^{cB}	56.11 ± 0.49 ^{cB}	87.97 ± 12.43 ^{cB}	27.70 ± 0.44 ^{bB}
CCM30	DFS	301.43 ± 34.28 ^b	104.60 ± 14.60 ^{dC}	34.70 ± 0.42 ^{dC}	29.00 ± 2.10 ^{eC}	9.62 ± 0.06 ^{dC}
CL30	Hamburger	336.29 ± 37.36 ^b	327.55 ± 36.53 ^{bX}	97.4 ± 0.94 ^{aX}	112.65 ± 12.20 ^{bX}	39.44 ± 0.35 ^{aX}
CL30	Bologna sausage	304.80 ± 25.88 ^b	170.97 ± 12.65 ^{cY}	56.09 ± 0.49 ^{cY}	51.11 ± 5.13 ^{dY}	16.77 ± 0.20 ^{cY}
CL30	DFS	311.52 ± 33.94 ^b	108.60 ± 10.00 ^{dZ}	34.86 ± 0.29 ^{dZ}	29.00 ± 5.30 ^{eZ}	9.31 ± 0.16 ^{dZ}

DFS: Dry fermented sausages.

Ca soluble: Ca determined in the supernatant fraction and available for absorption after digestion process (in the intestine).

% Ca in GP: [Ca determined in GP / Ca product] × 100.

% Ca available: [Ca soluble in IP / Ca product] × 100.

Minor letters: Different letters in the same column indicate significant differences between calcium in all the products analyzed.

Capital letters: Different letters in the same column indicate significant differences between the meat products enriched with the same calcium salt (food matrix effect).

CCM: Calcium citrate–malate. CL: Calcium lactate.

30 and 40: percentage of the calcium RDA.

In our case, the “meat product” factor was the most important one. It is probable that for hamburgers, the calcium added was solubilized in the aqueous fraction of the meat without remaining linked to any meat component or caught in meat structure. The liberation from this fresh meat would be very easy and the activity of the digestive enzymes would allow yielding a high quantity of free calcium. However, in the case of the bologna and dry fermented sausages the situation was different. These types of meat products have a more complex structure (Carballo, Fernández, Barreto, Solas, & Jiménez-Colmenero, 1996; Nayak, Kenney, Slider, Head, & Killefer, 1998; Ordóñez, Hierro, Bruna, & de la Hoz, 1999); both types are protein gel. The calcium favors the firmness of the network (Damodaran, 2007). If the calcium remains caught in these structures, the digestive enzymes could not liberate it entirely during the process of digestion.

This fact would be more accused in the case of the dry fermented sausages since the lack of water makes the components more concentrated. Consequently, it is easier that calcium creates cross-linkages among negative charged groups of proteins (Selgas & García, 2008), leading to a more intense protein–protein network. This makes the structure more firm and more difficult the liberation of Ca.

Table 2 shows the transport efficiency and percentage of transport obtained in the Caco-2 culture cell. Although the transport percentage was slightly higher in bologna sausages (12.71% and 11.35% in CCM30 and CL30 batches, respectively), no significant differences were

observed in relation to the fresh meat products (9.85%) and the control milk (9.75%), independently of the type of calcium salt amount added ($P > 0.05$). However, the percentage of transport significantly decreased ($P < 0.05$) in the dry fermented sausages down to 7.0% or 6.75% in the CCM30 and CL30 batches respectively.

These results suggest that the type of calcium salt is not the limiting factor and that the fat content of the dry fermented sausages could interfere with the calcium cross through the cell membrane. In this sense, it has been reported that the high content of fatty acids could decrease the absorption of this mineral (Haderslev, Jeppesen, Mortensen, & Staun, 2000; Van der Hee et al., 2009). So, free long-chain fatty acids form salts with divalent cations (calcium), yielding indigestible calcium soaps which are not well absorbed in the gastrointestinal tract and, therefore, reduce the absorption of calcium. This fact has been reported by Sarria (1998) who compared infantile formula with cow milk, and Van der Hee et al. (2009) in ice cream manufactured with different amounts of fat. It has been also demonstrated in human studies (Denke, Fox, & Schulte, 1993; Xue, Greenberg, Kraemer, & Zemel, 2001).

López-Huertas et al. (2006) reported that calcium triphosphate increases the calcium bioavailability more than caseinphosphopeptides or fructooligosaccharides, which have been proposed as enhancers to the absorption of calcium milk. Teucher et al. (2006) made similar considerations.

Authors like Whiting, Anderson, and Weeks (1997), Kerstetter, O'Brien, and Insogna (1998); Guéguen and Pointillart (2000) and Cámara, Barberá, Amaro, and Farré (2007) indicated that the protein content can also decrease the calcium absorption and pointed out that an excess of protein generally leads to an increase in the amount of calcium lost in the urine. This fact could be responsible for the values of hamburgers to be slightly lower than those of the bologna sausages, but in our case major relevance was not granted since the differences were not significant ($P < 0.05$).

One of the first works carried out in this way, Morrissey and Flynn (1972) reported that the absorption of calcium from cow's milk ranged between 21 and 45% in healthy adults. Moreover, Recker, Bammi, Barger-Lus, and Heany (1988) delimited this range from 21 to 26% in milk and milk products enriched with calcium carbonate. Nelson, Rogers, Frantz, and Ziegler (1996) reported 39% in infant milk formula; Sittikulwitit et al. (2004), a percentage of dialyzable calcium close to 28% in milk powder. The results obtained in our work agree with those described by Perales et al. (2005) who studied milk-based formulas and fruit juices containing milk and reported a wide range of values, between 1.6% and 20.7%, being the higher values those for fruit juices. Gonelli et al. (2007) reported 29% from enriched orange juice and Cilla et al. (2011) also obtained similar values to ours, 10.47 to 19.82% in fruit juices beverages, using used in both works Caco-2 cells to perform the analysis.

Table 2

Transport efficiency (mmol/ml) and percentage of transport of the calcium present in the different products assayed.

Calcium salt	Sample	C ₀	Transport efficiency ^t	Transport (%)
	Milk	19.9 ± 1.5 ^a	1.90 ± 0.14 ^a	9.75 ± 2.70 ^a
CCM40	Hamburger	20.0 ± 1.5 ^{aA}	1.97 ± 0.13 ^{aA}	9.85 ± 1.90 ^{aA}
CCM30	Bologna sausage	19.9 ± 1.3 ^{aA}	2.53 ± 0.18 ^{aA}	12.71 ± 1.80 ^{aA}
CCM30	DFS	20.0 ± 1.4 ^{aA}	1.40 ± 0.18 ^{aA}	7.00 ± 1.66 ^{bB}
CL30	Hamburger	20.0 ± 1.4 ^{aX}	1.99 ± 0.14 ^{aX}	9.98 ± 1.30 ^{aX}
CL30	Bologna sausage	20.0 ± 1.8 ^{aX}	2.27 ± 0.16 ^{aX}	11.35 ± 1.21 ^{aX}
CL30	DFS	20.0 ± 1.4 ^{aX}	1.35 ± 0.13 ^{aX}	6.75 ± 1.50 ^{bY}

C₀: calcium content in the apical chamber (mmol/ml).^tCalcium difference between the mineral detected in the basal chamber and the transport buffer.

Minor letters: Different letters in the same column indicate significant differences between calcium in all the products analyzed.

Capital letters: Different letters in the same column indicate significant differences between the meat products enriched with the same calcium salt (food matrix effect).

CCM: Calcium citrate–malate. CL: Calcium lactate.

30 and 40: percentage of the calcium RDA.

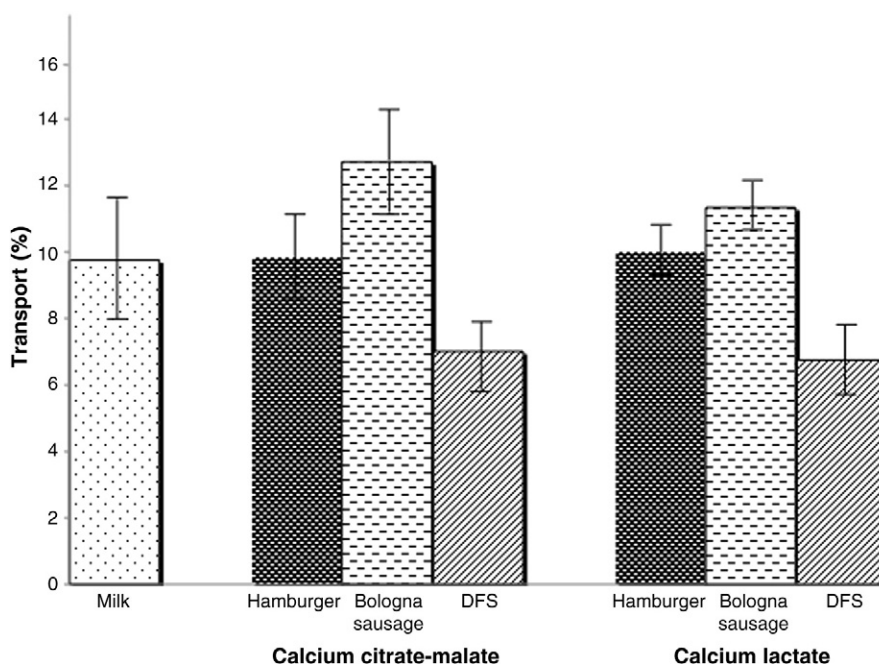


Fig. 2. Transport percentage of calcium by Caco-2 cells from the digests of meat products and milk.

Abrams (2010) indicated that neither the calcium source nor the dietary factors affects the absorption of this mineral. However, the dietary intake, genetic factors and vitamin D status are also considered to be important factors. For this reason, the calcium absorption has to be accounted in the context of a whole diet. In this sense, Mesías et al. (2009) analyzed the soluble calcium in two different diets which were given to teenagers and reported absorption of 10–15%. Cámara et al. (2007) studied the calcium transport in different school meals and also obtained a wide range of values, between 2.18% in fried hake and 33.9% in stew.

Cilla et al. (2011) determined that the transport percentage, using Caco-2 cells, on milk-based fruit beverages was described from 25.49% to 28.30%. These results were slightly higher than those obtained by us (Fig. 2). These authors also reported that these values of calcium transport increase if the juices have been summited at pasteurization or at a hydrostatic high pressure treatment probably due to the reaction products generated with both technologies. However, they also indicated that the differences obtained between the calcium transport, the calcium solubility and the uptake using this type of cells do not always show parallel trends, pointing out that although calcium would be in a soluble form suitable for uptake, other factors are involved in the absorption.

The percentage of Papp is a parameter used to establish a similarity between the results obtained with the Caco-2 culture cells and the cross through the enteric human membrane (Grès et al., 1998). In our work, the Papp ranged from 70% to 100% for milk and hamburger samples while it ranged from 20% to 70% in bologna and dry fermented sausages (data not shown). These high percentages suggest that our results would have a good correlation with an *in vivo* assay.

4. Conclusions

Calcium citrate-malate and calcium lactate can be used for the enrichment of meat products. The percentage of calcium available and calcium transported through the cell membrane was similar in milk, hamburger and bologna sausages and the differences seem to be more related to factors other than type of calcium salt, as the fat content and/or meat matrix. This fact was more evident in the dry fermented

sausages in which the percentage of transport was lower than 10% of the calcium added to the product. Furthermore, these products could be considered as a *source of calcium* according to the Regulation N° 1907/2006 of the European Parliament.

Acknowledgments

This work was supported by the projects CONSOLIDER-Ingenio 2010 (Ref. CSD2007-00016) and to the Group of Investigation BSCH-UCM No. 920276 (Ref. GR35/10A).

References

- Aarle, C., Bontenbal, E., & Potjewijd, R. E. (1997). The dialysability of calcium, magnesium and iron as a method to compare *in vitro* bioavailability of minerals in foods. Wageningen, (The Netherlands), book of abstracts, bioavailability '97.
- Abrams, S. A. (2010). Setting dietary reference intakes with the use of bioavailability data: Calcium. *American Journal of Clinical Nutrition*, 91, 1474S–1477S (Suppl.).
- Adluri, R. S., Zhan, L., Bagchi, M., Maulik, N., & Maulik, G. (2010). Comparative effects of a novel plant-based calcium supplement with two common calcium salts on proliferation and mineralization in human osteoblast cells. *Molecular and Cellular Biochemistry*, 340(1–2), 73–80.
- Artursson, P. (1990). Epithelial transport of drugs in cell culture: I: A model for studying the passive diffusion of drugs over intestinal absorptive (Caco-2 cells). *Journal of Pharmaceutical Sciences*, 79(6), 476–482.
- Benito, P., & Miller, D. (1998). Iron absorption and bioavailability: An updated review. *Nutrition Research*, 18, 581–603.
- Brodaus, A. E. (1996). Mineral balance and homeostasis. In M. J. Favus (Ed.), *Primer on the metabolic bone diseases and disorders of mineral metabolism* (pp. 57–63). Philadelphia, (USA): Lippincott-Raven.
- Cáceres, E., García, M. L., & Selgas, M. D. (2006). Design of a new cooked meat sausage enriched with calcium. *Meat Science*, 73, 368–377.
- CacoReady (2010). *Kit CacoReady™ for Caco-2 cells. User's manual*. Barcelona. Spain: Advantell©.
- Cámara, F., Barberá, R., Amaro, M. A., & Farré, R. (2007). Calcium, iron, zinc and copper transport and uptake by Caco-2 cells in school meals: Influence of protein and mineral interactions. *Food Chemistry*, 100, 1085–1092.
- Cámara-Martos, F., & Amaro-López, M. A. (2002). Influence of dietary factors on calcium bioavailability. *Biological Trace Element Research*, 89, 43–52.
- Carballo, J., Fernández, P., Barreto, G., Solas, M. T., & Jiménez-Colmenero, F. (1996). Morphology and texture of bologna sausages as related to content of fat, starch and egg white. *Journal of Food Science*, 61, 652–655.
- Charman, W. N., Porter, C. J. H., Mithani, S., & Dressman, J. B. (1997). Physico-chemical and physiological mechanisms for the effects of food on drug absorption: The role of lipids and pH. *Journal of Pharmaceutical Sciences*, 86, 269–282.

- Charoenkiattui, S., Kriengsinyos, W., Tuntipopipat, S., Suthutvoravut, U., & Weaver, C. M. (2008). Calcium absorption from commonly consumed vegetables in healthy Thai women. *Health, Nutrition and Food*, 73(9), 218–608.
- Cilla, A., Lagarda, M. J., Alegria, A., Ancos, B., Cano, M. P., Sánchez-Moreno, C., et al. (2011). Effect of processing and food matrix on calcium and phosphorous bioavailability from milk-base fruit beverages in Caco-2 cells. *Food Research International*, 44, 3030–3038.
- Costa, F. F., Resende, J. V., Abreu, L. R., & Goff, H. D. (2008). Effect of calcium chloride addition on ice cream structure and quality. *Journal of Dairy Science*, 91(6), 2165–2174.
- Daengprok, W., Garnjanagoonchorn, W., & Mine, Y. (2002). Fermented pork sausage fortified with commercial or hen eggshell calcium lactate. *Meat Science*, 62, 199–204.
- Damodaran, S. (2007). Amino acids, peptides and proteins. In S. Damodaran, K. L. Parkin, & O. R. Fennema (Eds.), *Fennema food chemistry* (pp. 217–329) (4th ed.). Boca Raton, FL, USA: CRC Press.
- Denke, M.A., Fox, M. M., & Schulte, M. C. (1993). Short-term dietary calcium fortification increases fecal saturated fat content and reduces serum lipids in men. *Journal of Nutrition*, 123, 1047–1053.
- El-Sayed, M., Ginski, M., Rhodes, C., & Ghandehari, H. (2002). Transepithelial transport of poly (amidoamine) dendrimers across Caco-2 cell monolayers. *Journal of Controlled Release*, 81, 355–365.
- European Parliament (December 18). Regulation (EC) No 1907/2006 of the European Parliament. *Official Journal of the European Union*, L396/1–849.
- European Parliament (October 28). Directive 2008/100/EC of the European Parliament. *Official Journal of the European Union*, L285/9–12.
- Fernández-García, E., Carvajal-Lérida, I., & Pérez-Gálvez, A. (2009). In vitro bioaccessibility assessment as a prediction tool of nutritional efficiency. *Nutrition Research*, 29, 751–760.
- Fossati, L., Dechaume, R., Hardillier, E., Chevilion, D., Prevost, C., Bolze, S., et al. (2008). Use of simulated intestinal fluid for Caco-2 permeability assay of lipophilic drugs. *International Journal of Pharmaceutics*, 360(1–2), 148–155.
- Frontela, C., Scarino, M. L., Ferruzza, S., Ros, G., & Martínez, C. (2009). Effect of dephytinization on bioavailability of iron, calcium and zinc from infant cereals assessed in the Caco-2 cell model in infant formula. *World Journal of Gastroenterology*, 15(16), 1977–1984.
- Galán, I., García, M. L., & Selgas, M.D. (2010). Effects of irradiation on hamburgers enriched with folic acid. *Meat Science*, 84, 437–443.
- Gonelli, S., Campagna, M. S., Montagnani, A., Caffarelli, C., Cadrini, A., Giorgi, G., et al. (2007). Calcium bioaccessibility from a new calcium-fortified orange beverage, compared with milk, in healthy volunteers. *International Journal of Vitamin and Nutrition Research*, 77(4), 249–254.
- Grès, M. C., Julian, B., Bourrié, M., Meunier, V., Roques, C., Berger, M., et al. (1998). Correlation between oral drug absorption and apparent drug permeability in TC-7 cells, a human epithelial intestinal cell line: Comparison with the parental Caco-2 cell line. *Pharmaceutical Research*, 15(5), 726–733.
- Guéguen, L., & Pointillart, A. (2000). The bioaccessibility of dietary calcium. *Journal of the American College of Nutrition*, 19(2), 119S–136S.
- Haderslev, K. V., Jeppesen, P. B., Mortensen, P. B., & Staun, M. (2000). Absorption of calcium and magnesium in patients with intestinal resections treated with medium chain fatty acids. *Gut*, 46, 819–823.
- Hartmann, R., & Meisel, H. (2002). Cytochemical assessment of phospho-peptides derived from casein as potential ingredients for functional food. *Nahrung*, 46, 427–431.
- Heany, R. P., Abrams, S., Lawson-Hughes, B., Looker, A., Marcus, R., Matkovic, V., et al. (2000). Peak bone mass. *Osteoporosis International*, 11, 985–1009.
- Hidalgo, I. J., Raub, T. J., & Borchardt, R. T. (1989). Characterization of the human colon carcinoma cell line (Caco-2) as a model system for intestinal epithelial permeability. *Gastroenterology*, 96, 736–749.
- Institute of Medicine (IOM) (2010). *Dietary reference intakes: Recommended intakes for individuals*. USA: Department of Agriculture.
- Irvine, J.D., Takahashi, L., Lockhart, K., Cheong, J., Tolan, J. W., Selick, H. E., et al. (1999). MDCK (Madin-Darby Canine Kidney) cells: A tool for membrane permeability screening. *Journal of Pharmaceutical Sciences*, 88(1), 28–33.
- Jovaní, M., Barberá, R., & Farré, R. (2001). Review: Effect of some components of milk- and soy-based infant formulas on mineral bioavailability. *Food Science and Technology International*, 7, 191–198.
- Kamchan, A., Puwastien, P., Sirichakwal, P. P., & Kongkachuichai, R. (2004). In vitro calcium bioavailability of vegetables, legumes and seeds. *Journal of Food Composition and Analysis*, 17, 311–320.
- Kerstetter, J. E., O'Brien, K. O., & Insogna, K. L. (1998). Dietary protein affects intestinal calcium absorption. *American Journal of Clinical Nutrition*, 68, 859–865.
- Korstanje, R., & Hoek, M. (2001). Calcium and other minerals. In J. Young (Ed.), *Guide to functional food ingredients* (pp. 196–234). Surrey (England): Leatherhead Publishing.
- Le Ferrec, E., Chesne, C., Artisson, P., Brayden, D., Fabre, G., Gires, P., et al. (2001). In vitro models of the intestinal barrier. *ECVAM Workshop Report 46*. Atla, 29, (pp. 649–668).
- López-Huertas, E., Teucher, B., Boza, J. J., Martínez-Férez, A., Majsak-Newman, G., Baró, L., et al. (2006). Absorption of calcium from milks enriched with fructooligosaccharides, caseinophosphopeptides, tricalcium phosphate and milk solids. *American Journal of Clinical Nutrition*, 83, 310–316.
- Lu, S., Gough, A., Bobrowski, W. F., & Stewart, B. (1996). Transport properties are not altered across Caco-2 cells with heightened TEER despite underlying physiological and ultrastructural changes. *Journal of Pharmaceutical Sciences*, 85(3), 270–273.
- Mehran, F., Grant, D., Cheek, J., Greene, J., Williamson, K., & Hammock, B. (1997). Bioactivation of leukotoxins to their toxic diols by epoxide hydrolase. *Nature Medicine*, 3, 562–566.
- Mekmene, O., Le Graët, Y., & Gaucheron, F. (2009). A model for predicting salt equilibria in milk and mineral-enriched milks. *Food Chemistry*, 116, 233–239.
- Mesías, M., Seiquer, I., & Navarro, M. P. (2009). Influence of diets rich in Maillard reaction products on calcium bioavailability. Assays in male adolescents and in Caco-2 cells. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, 57, 9532–9538.
- Miller, G. D., Jarvis, J. K., & McBean, D. (2001). Review: The importance of meeting calcium needs with foods. *Journal of the American College of Nutrition*, 20, 168–185.
- Moreiras, O., Carbajal, A., Cabrera, L., & Cuadrado, C. (2003). Tablas de composición de alimentos. *Tablas de composición de alimentos: colección "ciencia y tecnología"* (pp. 37–70). Humanes de Madrid (Spain): Pirámide, grupo Anaya S.A.
- Morrissey, P. A., & Flynn, A. (1972). Bioavailability of minerals in milks. In S. K. Kon (Ed.), *Milk and milk products in human nutrition*. FAO Nutritional Studies.
- Moseley, K., & de Beur, S. (2011). *Principles of gender-specific medicine* (pp. 716–736). London (UK): Elsevier Academic Press (Chapter 59).
- Nayak, R., Kenney, P. B., Slider, S., Head, M. K., & Killefer, J. (1998). Cook yield, texture and gel ultrastructure of model beef batters as affected by low levels of calcium, magnesium and zinc chloride. *Journal of Food Science*, 63, 945–950.
- Neilson, A., & Ferruzzi, M. (2013). *Nutrition in the prevention and treatment of disease* (3rd ed.). London (UK): Academic Press (Chapter 22).
- Nelson, E., Rogers, R. R., Frantz, J. A., & Ziegler, E. E. (1996). Palm olein in infant formula: Absorption of fat and minerals by normal infants. *American Journal of Clinical Nutrition*, 64, 291–296.
- Oomen, A. G., Romperberg, C. J. M., Bruil, M.A., Dobbe, C. J. G., Pereboom, D. P. K. H., & Sips, A. J. A.M. (2003). Development of an in vitro digestion model for estimating the bioaccessibility of soil contaminants. *Archives of Environmental Contamination and Toxicology*, 44, 281–287.
- Ordóñez, J. A., Hierro, E. M., Bruna, J. M., & de la Hoz, L. (1999). Changes in the composition of dry fermented sausages during ripening. *Critical Reviews in Food Science and Nutrition*, 39(4), 329–367.
- Perales, S., Barberá, R., Lagarda, M. J., & Farré, R. (2005). Bioavailability of calcium from milk-based formulas and fruit juices containing milk and cereals estimated by in vitro methods (solubility, dialyzability and uptake and transport by Caco-2 cells). *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, 53, 3721–3726.
- Prince, R., Devine, A., Dhaliwal, S., & Dick, I. (2006). Effects of calcium supplementation on clinical fracture and bone structure. *Archives of Internal Medicine*, 24(166), 869–875.
- Recker, R. R., Bammi, M. S., Barger-Lus, M. J., & Heany, R. P. (1988). Calcium absorbability from milk products, and imitation milk and calcium carbonate. *American Journal of Clinical Nutrition*, 47, 93–95.
- Roig, M. J., Alegria, A., Barberá, R., Farré, R., & Lagarda, M. J. (1999). Calcium dialysability as an estimation of bioavailability in human milk, cow milk and infant formulas. *Food Chemistry*, 64, 403–409.
- Sarria, B. (1998). *Efectos del tratamiento térmico de formulas infantiles y leche de vaca sobre la biodisponibilidad mineral y proteica*. (Tesis Doctoral). Madrid: Instituto de Nutrición y Bromatología. Centro mixto CSIC-UCM. Facultad de Biológicas. UCM.
- Selgas, M.D., & García, M. L. (2008). Meat products enriched with calcium. In J. Fernández (Ed.), *Technological strategies for functional meat products* (pp. 57–85). Kerala (India): Transworld Research Network.
- Selgas, M.D., Salazar, P., & García, M. L. (2009). Usefulness of calcium lactate, citrate and gluconate for calcium enrichment of dry fermented sausages. *Meat Science*, 82, 478–480.
- Sheikh, M. S., Santa Ana, C. A., Nicar, M. J., Schiller, L. R., & Fordtran, I. S. (1987). Gastrointestinal absorption of calcium from milk and calcium salts. *The New England Journal of Medicine*, 317, 532–536.
- Shiowatana, J., Kitthikhun, W., Sottima, U., Promchan, J., & Kunajiraporn, K. (2006). Dynamic continuous-flow dialysis method to simulate intestinal digestion for in vitro estimation of mineral bioaccessibility of food. *Talanta*, 68, 549–557.
- Singh, G., Arora, S., Sharma, G. S., Sindhu, J. S., Kansal, V. K., & Sangwan, R. B. (2007). Heat stability and calcium bioavailability of calcium-fortified milk. *LWT—Food Science and Technology*, 40, 625–631.
- Sittikulwitit, A., Sirichakwal, P. P., Puwastien, P., Chavasi, V., & Shungpuag, P. (2004). In vitro bioavailability of calcium from chicken bone extract powder and its fortified products. *Journal of Food Composition and Analysis*, 17(3–4), 321–329.
- Smetanová, L., Stetinová, V., Svoboda, Z., & Kvetina, J. (2011). Caco-2 cells, biopharmaceutics classification system (BCS) and bioavailability. *Acta Medica (Hradec Králové)*, 54(1), 3–8.
- Soto, A.M., Carrión, R., García, M. L., & Selgas, M.D. (2010). Proceso de elaboración de embutidos madurados hipocalóricos y enriquecidos con citrato-malato cálcico. *Actas VI Congreso Español de Ingeniería de Alimentos, CESIA. Ref. DOP 05. Logroño, Spain, 6–8 October 2010* 978-84-7359-654-1.
- Soto, A.M., Galán, I., Gámez, C., García, M. L., & Selgas, M.D. (2010). Sensory properties of fresh meat products enriched with calcium. *Fourth European Conference on Sensory and Consumer Research. A Sense of Quality, Ref. 1.039. Vitoria-Gasteiz, Spain, 5–8 September 2010* (pp. 5–8).
- Soto, A.M., Morales, P., Haza, A. I., García, M. L., & Selgas, M.D. (2012). Bioaccesibilidad del calcio incorporado a productos cárnicos cocidos. *VIII Congreso Español de Ingeniería de Alimentos CESIA. Ref. BIO-P15. Ciudad Real. Spain, 7–9 November 2012* (pp. 170) 978-84-695-4196-8.
- Straub, D. (2007). Calcium supplementation in clinical practice: A review of forms, doses and indications. *Nutrition in Clinical Practice*, 22(3), 286–296.
- Tallkvist, J., Bowlus, C., & Lönnerdal, B. (2000). Functional and molecular responses of human intestinal Caco-2 cells to iron treatment. *American Journal of Clinical Nutrition*, 72, 770–775.
- Teucher, B., Majsak-Newman, G., Dainty, J. R., McDonagh, D., FitzGerald, R. J., & Fairweather-Tait, S. J. (2006). Calcium absorption is not increased by caseinophosphopeptides. *American Journal of Clinical Nutrition*, 84, 162–166.
- Tornberg, E. (2005). Effects of heat on meat proteins. Implications on structure and quality of meat products. *Meat Science*, 70, 493–508.
- Vaisberg, E., Lenzi, D., Hansen, R., Keon, B., & Finer, J. (2006). An infrastructure for high-throughput microscopy: Instrumentation, informatics, and integration. *Methods in Enzymology*, 414, 484–512.

- Van der Hee, R., Miret, S., Slettenaar, M., Duchateau, B., Rietveld, A., Wilkinson, J., et al. (2009). Calcium absorption from fortified ice cream formulations compared with calcium absorption from milk. *Journal of the American Dietetic Association*, 109(5), 830–835.
- Viadel, B., Barberá, R., & Farré, R. (2006). Uptake and retention of calcium iron, and zinc from raw legumes and the effect of cooking in lentils in Caco-2 cells. *Nutrition Research*, 26, 591–596.
- Whiting, S. J., Anderson, D. J., & Weeks, S. J. (1997). Calciuric effects of protein and potassium bicarbonate but not of sodium chloride or phosphate can be detected acutely in adult women and men. *American Journal of Clinical Nutrition*, 65, 1465–1472.
- Xue, B., Greenberg, A. G., Kraemer, F. B., & Zemel, M. B. (2001). Mechanism of intracellular calcium ([Ca²⁺]) inhibition of lipolysis in human adipocytes. *The FASEB Journal*, 15, 2527–2529.

Capítulo 5: DISCUSIÓN INTEGRADORA

Capítulo 5: Discusión integradora

Cada vez es mayor el número de consumidores que se preocupan en saber qué es lo que compran. La búsqueda de un estilo de vida más equilibrado, basado en el descanso, deporte y comida saludable, está relacionado con un creciente conocimiento de que nuestra perspectiva de salud, bienestar y longevidad. Los alimentos que tomamos son un punto clave para lograr el objetivo deseado.

Los alimentos ecológicos y los funcionales se han hecho un hueco en los mercados, siendo cada vez mayor su demanda. El concepto de alimento funcional surge en el seno de la Nutrición Óptima, encaminada a modificar u optimizar aspectos fisiológicos que contribuyan a la prevención y reducción del riesgo de padecer enfermedades, más allá de la mera cobertura de las necesidades de nutrientes. El objetivo que se persigue con el diseño de alimentos funcionales es, por lo tanto, la mejora de la salud alcanzando el máximo bienestar y una buena calidad de vida cubriendo, además, las expectativas organolépticas de los consumidores.

Para conseguir este objetivo es necesario tener en cuenta dos aspectos fundamentales: la investigación científica y el desarrollo tecnológico a nivel industrial. Para ello se están realizando en la actualidad muchas investigaciones encaminadas a conocer nuevos ingredientes funcionales, a desarrollar nuevas formulaciones y a modificar o adaptar el proceso de fabricación convencional con el fin de asegurar la bioaccesibilidad de los ingredientes añadidos durante el procesado y el almacenamiento. Solo así, se puede asegurar que el ingrediente incorporado puede llegar a cumplir la función fisiológica que le corresponde (Zhang y col., 2010). Esto conlleva además, fuertes inversiones económicas. Un ejemplo claro del resultado de estas investigaciones, es la detección de péptidos bioactivos que se generan durante la maduración de los productos cárnicos o simplemente durante la digestión de los alimentos; estos péptidos se liberan en el intestino y ejercen su papel funcional, como es el caso de los péptidos antihipertensivos, antioxidantes o de actividad probiótica, con su correspondiente contribución a la salud del consumidor (Arihara, 2006)

La industria alimentaria ha realizado importantes inversiones en el desarrollo de estos alimentos, para ampliar la gama de productos saludables que se ofertan al consumidor. El aspecto económico del mercado de alimentos funcionales también es muy importante y por ello, uno de los primeros pasos a seguir por la industria es

establecer cuáles podrían ser los productos de mayor éxito en el mercado, cuál sería el compuesto bioactivo que tendría un mayor interés para el consumidor y diseñar el nuevo producto buscando la estabilidad del compuesto añadido y proteger así su bioactividad. De hecho se tiene en cuenta no solo el procesado, sino también las condiciones de almacenamiento y las recomendaciones para su consumo. Así, se han desarrollado nuevas técnicas que permiten optimizar el método de incorporación de un determinado nutriente; es el caso de la microencapsulación o la formación de microemulsiones que actúan como un buen vehículo, por ejemplo, de compuestos hidrófobos (Garti y Aserin, 2012). No hay que olvidar que para que un alimento sea considerado funcional debe cumplir todos los requisitos recogidos en el reglamento 1924/2006 del Parlamento europeo y del Consejo donde se cita textualmente *el fundamento científico debe ser el aspecto principal a tener en cuenta para el uso de las declaraciones nutricionales y de propiedades saludables y los explotadores de empresas alimentarias deben justificarlas*.

La aceptación de los alimentos funcionales varía mucho de unos países a otros y así, su éxito es mayor, por ejemplo, en Finlandia que en Dinamarca o Estados Unidos (Saher y col., 2004). La aceptación varía también en función del ingrediente incorporado, de lo atractiva que suponga su ingesta y del tipo de alimento que se haya enriquecido. No hay que olvidar que los productos funcionales deben formar parte de la dieta habitual y es de todo punto deseable que el consumidor no modifique sus hábitos de alimentación (Ares y Gámbaro, 2007). En términos generales, los consumidores encuentran más justificado el enriquecimiento de alimentos “poco saludables” que el enriquecimiento de aquellos alimentos que se perciben como “saludables *per se*” como el yogurt, cereales, pan y zumos (Siró y col., 2008).

En este contexto cabe preguntarse sobre el papel del sector cárnico en el desarrollo de la alimentación funcional. La industria cárnica es una de las principales en el sector alimentario de nuestro país, constituye aproximadamente el 2% del PIB y en torno al 20% de los gastos en alimentación de los españoles, corresponde a carne y productos cárnicos (Mercasa, 2014). En la actualidad está haciendo grandes esfuerzos por innovar sus productos aplicando nuevos procesos, nuevas tecnologías, encaminados a introducir en el consumidor el deseo de incorporar de nuevo los productos cárnicos en su dieta. La relación entre el consumo de carne y enfermedades como las cardiovasculares y la obesidad ha tenido connotaciones negativas muy

importantes y ha hecho que el consumo de carne se haya reducido de forma notable. Estos aspectos negativos se verían paliados por la aparición de nuevos productos cárnicos funcionales que aporten aspectos positivos, una nueva imagen, por el valor añadido que aportan y, en consecuencia, contribuyan reflotar la industria de los productos cárnicos.

Desde el punto de vista nutricional, la carne es uno de los alimentos con un mayor valor nutritivo a pesar de que alguno de sus componentes (grasa) puede tener un efecto negativo en la salud. Sin embargo, los productos cárnicos tienen algunos aspectos, que la convierten en un buen vehículo de compuestos bioactivos, como son su frecuencia y nivel de consumo elevado, la gran variedad de productos y presentaciones y su buena acogida, por ejemplo en los países de la cuenca mediterránea, entre los que se encuentra España.

Por ello, resulta muy atractiva su transformación en alimentos funcionales en los que, sin modificar los hábitos del consumidor, se potencie la eliminación o incorporación de ingredientes concretos orientados incluso a grupos específicos de población en situación de riesgo de determinadas enfermedades crónicas o estados carenciales (Olmedilla-Alonso y col., 2013; Olmedilla-Alonso y Jiménez-Colmenero, 2014).

Una de las estrategias llevadas a cabo para el desarrollo de los productos cárnicos funcionales, ha sido la incorporación de nutrientes o compuestos bioactivos de reconocido valor nutritivo, siendo de vital importancia la elección del compuesto, su estabilidad tecnológica y sensorial, así como el conocimiento de su bioaccesibilidad. Dentro de esta estrategia, se encuentra la incorporación de minerales y, entre ellos, del calcio que es el que nos ocupa en el presente trabajo.

El calcio, como ya se ha mencionado en el Capítulo 1, es uno de los minerales más importantes en el organismo humano, por su relevante papel fisiológico. No sólo se encarga de mantener la integridad del sistema óseo, sino que también interviene en la contracción muscular, incluido el músculo cardíaco, la transmisión nerviosa y en la cascada de reacciones implicadas en la coagulación.

Su repercusión en la salud es tan importante que para evitar el déficit de calcio, desde hace más de una década, las autoridades sanitarias a nivel mundial han establecido las cantidades de calcio que se recomiendan al día para tener unos niveles

séricos que permitan prevenir algunas de las enfermedades asociadas. Estas cantidades varían en función del sexo, la edad de los individuos, con especial referencia al desarrollo infantil, y también tienen en cuenta diferentes situaciones fisiológicas como el embarazo, la lactancia o la menopausia, en las que la ingesta de calcio debe ser superior para asegurar la correcta formación del feto, la producción de leche materna sin alterar las reservas óseas de calcio, el buen desarrollo del sistema esquelético en los niños y el control de la osteoporosis (Heany, 2000; Miller y col., 2001; Zemel, 2001; McCarrom and Heany, 2004; Unruh y col., 2004).

Son varias las normativas que así lo indican como el Real Decreto 1669/2009 de 6 de noviembre (BOE, núm. 269) que establece los nutrientes que pueden declararse en el etiquetado así como la Ingesta Diaria Recomendada (IDR) de cada uno de ellos. Más aún, en dicho Real Decreto queda indicado que la IDR del calcio es de 800 mg/día y de la vitamina D, de 5 µg/día. El Parlamento Europeo, en la Directiva Europea 2008/100/EC, así como en el Instituto de Medicina de los Estados Unidos (2010), se determinó la ingesta diaria recomendada de calcio en base a los grupos poblacionales o el estado fisiológico de los individuos, de tal forma que en la gestación y en la lactancia se determinó que la misma debería de ser de 1200 mg/días según la Directiva Europea 2008/100/EC; mientras que la IOM (2010) determinó que fuese de 1000-1300 mg/día.

En lactantes y jóvenes, el Instituto de Medicina (2010) es más exhaustivo, indicando que la IDR para niños y lactantes será de 400 mg/día durante los 6 primeros meses de vida, durante los 6 siguientes meses será de unos 600 mg/día y por último, de 800 mg/día desde el año de vida hasta los 10. Por el contrario, la Directiva Europea indica, sólo para lactantes y jóvenes, sin especificar rangos de edad, que la IDR debe ser de 700 mg/día y en adultos, será de 800 mg/día, mientras que el IOM determina que, en este último grupo, la ingesta debería ser de 1000 mg/día en aquellos individuos comprendidos entre los 19-50 años. No obstante, a diferencia de la Directiva, el Instituto de Medicina (2010) sí que incluye otro grupo, el de "las mujeres posmenopáusicas y mayores de 65 años" quienes deben tomar una ingesta de calcio de 1200 mg/día para evitar una resorción ósea excesiva.

Por todo lo anteriormente expuesto, el planteamiento del trabajo ha sido diseñar productos cárnicos funcionales enriquecidos en calcio mediante la incorporación de diferentes sales cálcicas de alta bioaccesibilidad, estudiando sus

características tecnológicas y sensoriales. Como no puede ser de otra manera, este estudio se ha completado con ensayos encaminados a conocer la bioaccesibilidad de este mineral a partir de los nuevos productos diseñados.

Este capítulo se ha preparado con el propósito de realizar un análisis integral de los principales resultados obtenidos con un enfoque diferente al proporcionado por las publicaciones incluidas. Se pretende aportar una visión general de las consecuencias producidas por la incorporación de las sales cálcicas seleccionadas en las propiedades tecnológicas y sensoriales así como su bioaccesibilidad.

5.1. Viabilidad tecnológica de productos cárnicos enriquecidos con calcio

5.1.1. Elaboración de los productos cárnicos enriquecidos con calcio.

➤ Productos cárnicos frescos

De acuerdo con la reglamentación española (Orden 14 de Enero de 1986) Boletín Oficial del Estado del 21 de enero de 1986 modificado por Real Decreto 135/2010, de 12 de febrero, (Boletín Oficial del Estado de 25 de febrero de 2010) se considera carne picada, al producto constituido por carne magra de vacuno, ovino, porcino, debidamente picada que no ha sufrido ni la acción del calor, ni la maduración, ni la maceración, no admitiéndose la incorporación de ningún tipo de ingrediente.

La carne picada es la base de uno de los productos cárnicos de mayor aceptación a nivel mundial y de mayor consumo: la hamburguesa. Normalmente como hamburguesa se entiende *un alimento procesado en forma de bocadillo o sándwich de carne picada aglutinada en forma de filete, cocinado a la parrilla o a la plancha, aunque también puede freírse u hornearse*. La hamburguesa es en la actualidad un alimento tan popular, que aparece con diversas variantes, en casi todas las culturas del mundo. Esta primacía es la que ha hecho que se considere el producto cárnico fresco más adecuado para su inclusión en el presente trabajo.

Como materia prima se utilizó aguja de ternera (*Quadriceps femoris*). El picado y moldeado se hizo en la Planta Piloto del Departamento manteniendo la carne a temperaturas inferiores a 7° con el fin de no producir un embarrado.

La mitad de la carne picada se utilizó para elaborar diferentes lotes de hamburguesas: un lote control (sin sal cálcica) y nueve lotes más, enriquecidos con las

tres sales ensayadas (tres GC, tres con LC y otros tres son CMC, en concentración suficiente para aportar el 20-30-40% de la IDR del calcio. Con la otra mitad de la carne picada se prepararon los mismos lotes pero, además de las sales de calcio, se añadió a todos, una pequeña cantidad de NaCl (1,5%) con el fin de comprobar si la sal común, como potenciador de sabor, mitigaba, los matices de sabores extraños que pudieran derivarse de las sales de calcio.

Cada hamburguesa fue de 50 g y todos los lotes se mantuvieron en refrigeración a 2°C hasta su análisis, nunca más de 24 h.

El cocinado de las hamburguesas se realizó en las instalaciones de la Sala de Catas que dispone el Departamento, utilizando una plancha eléctrica precalentada a 180° C. Las hamburguesas fueron cocinadas durante 2 min por cada cara, para asegurar que la temperatura alcanzada en el interior de la muestra fuese de aproximadamente 60° C; este tratamiento fue suficiente para alcanzar el suficiente grado de “hecho”. Se sirvieron a los panelistas de forma inmediata para que la cata se realizase a la temperatura adecuada para poder apreciar sus características sensoriales (50-55°C).

➤ **Productos cárnicos cocidos**

Uno de los embutidos cocidos más tradicionales es la mortadela. Es un producto que admite numerosas variantes entre las que se encuentra la Bolonesa, considerada junto con las salchichas, uno de los productos cárnicos más populares y consumidos a nivel mundial. Su venta supuso el 8,6% de las realizadas en productos cárnicos en 2013 (Mercasa, 2014). Lo más importante para nuestro trabajo es que se trata de una pasta fina básica que, tras el tratamiento térmico, se convierte en un gel cárnico suave. Es un producto fácil y rápido de elaborar y de reproducir por lo que se ha considerado un modelo idóneo para realizar este estudio. La formulación realizada se corresponde a la más comúnmente utilizada en la industria cárnica y que fue cedida por la empresa Anvisa (Arganda del Rey, Madrid): 55% de magro de cerdo, 30% de grasa (tocino dorsal de cerdo), 10% agua en forma de hielo y 5% especias. Esta misma empresa fue la proveedora de la mezcla de especias utilizada (Procavi® “C-50” Ref.: 527) y cuya composición se detalla en el Apartado 3.2.1.2. de Material y Métodos (“Elaboración de productos cárnicos cocidos”).

La pasta fina se preparó en una cutter utilizando la carne semicongelada y utilizando el método de la Pasta Total (Antequera y Tejeda, 2001).

Las sales de calcio se mezclaron con las especias y se incorporaron a la carne picada en dos tiempos para que la emulsión se forme con mayor facilidad. La masa obtenida era firme, compacta, de un color rosado intenso y aspecto brillante y filiforme, tal y como corresponde a una buena pasta fina. La temperatura de la masa nunca fue superior a 2°C. A continuación se procedió a su embutición y cocción en un horno de vapor.

➤ **Productos cárnicos madurados**

La clasificación de los embutidos madurados no se hace en base a sus propiedades físico-químicas sino según el tamaño de partícula y los ingredientes empleados en su fabricación. Estos embutidos se pueden definir como *aquellos elaborados mediante selección, troceado y picado de carnes, grasas, con y sin despojos, que llevan incorporados condimentos, especias y aditivos autorizados, sometidos a maduración y desecación (curado) y, opcionalmente, ahumado*. Son muchos los productos madurados que se pueden encontrar en el mercado español y a nivel mundial, elaborados con unas condiciones más o menos específicas que les confieren una identidad propia. En España, los más comunes son el chorizo y el salchichón. Su diferencia fundamental radica en el tamaño de la partícula de las carnes magra y grasa y en la mezcla de especias utilizada, entre las que se encuentra el pimentón, una especia típica y característica del chorizo y ausente en el salchichón. Al no tener pimentón, el salchichón es un producto más fácil, cómodo y limpio en el manejo, tanto durante su fabricación como en el laboratorio. Por estas razones, se seleccionó como modelo de producto cárnico madurado.

Para su fabricación, se utilizó el mismo tipo de carne magra y grasa que para los productos cocidos y la mezcla de especias y aditivos fue también específico para este tipo de embutidos (Salavi®) y proporcionada por la empresa Anvisa (Arganda del Rey, Madrid). Su composición se describe en el Apartado 3.2.1.3 de Material y Métodos “Elaboración de productos cárnicos madurados”.

La normalización del producto se consiguió incorporando el cultivo iniciador Bactoferm® T-SC-150 (Chr-Hansen, Hørsholm, Dinamarca), compuesto por dos cepas, *Staphylococcus carnosus* y *Lactobacillus sakei*, tal y como se indica en el Apartado 3.2.1.3 de Material y Métodos.

Para la elaboración de estos productos, el magro y el tocino se adquirieron en un comercio local. El transporte y el manejo fue el mismo que el descrito en los productos cocidos e igualmente, las sales de calcio se incorporaron en mezcla con las especias. El número y el tipo de lotes fue el mismo que los descritos en los productos cárnicos cocidos.

La cantidad que se añadió de cada una de las sales cálcicas fue la mitad de la que se incorporó a los productos cárnicos frescos y cocidos debido a la pérdida de agua que tiene lugar durante el proceso de maduración y que se estima en torno al 50% (Ordóñez y col., 1999).

5.1.2. Características físico-químicas y microbiológicas de los productos cárnicos.

Los parámetros físico-químicos, en términos generales, no se modificaron de forma importante con la incorporación de ninguna de las sales cálcicas ensayadas.

Al analizar la a_w , los valores medios fueron de 0,945 y 0,989 en las hamburguesas elaboradas con y sin NaCl, respectivamente; en torno a 0,962 para productos cárnicos cocidos y de 0,882 en los madurados. Los resultados obtenidos son muy similares a los descritos en la literatura científica para estos mismos tipos de productos cárnicos convencionales. Es el caso de los trabajos realizados por Lawrie (1998) y Poulanne y Halonen (2010) en carne picada, por Cáceres y col., (2006); Ayo y col. (2008) y Galán y col., (2010) en productos cocidos funcionales (salchichas y mortadela, respectivamente) y por Ordóñez y col., (1999); Mendoza y col., 2001; Muguerza y col, 2004; Urso y col., 2006; Calvo y col., 2008; Selgas y col., 2009 o Galán y col. (2011^b) en cárnicos madurados.

Sin embargo, las sales cálcicas estudiadas indujeron cambios en el **pH** de los productos frescos y cocidos. Los valores de pH obtenidos en hamburguesas estaban en torno a 5,92 en los enriquecidos con CMC y 5,50 en los lotes con LC, que fueron significativamente diferentes del resto de los lotes.

En los productos cocidos, los valores de pH oscilaron entre 5,60 en los lotes con GC, 5,75 con CMC y 6,16 en los lotes con LC, siendo más significativa cuanto mayor es la cantidad de sal incorporada.

En el caso de los productos madurados el pH se encontró en valores medios de 4,98 sin diferencias significativos independientemente del tipo y la cantidad de sal

añadida. Esto indica que el pH en estos productos está gobernado por la microbiota presente. Estos resultados aseguran la viabilidad de los productos, de acuerdo a lo indicado por la FDA (2014).

Sin embargo, es importante tener en cuenta que cualquiera de estos valores son los habituales en estos tipos de productos cárnicos. En este sentido se pueden citar los obtenidos por Poulanne y Halonen (2010) en productos cárnicos frescos y por Ordóñez y col., 1999; Salazar y col., 2009; Selgas y col., 2009^b, Galán y col. (2011^b) en madurados. En los cárnicos cocidos son similares a los descritos por Devatkal y Mendiratta (2001) y Cáceres y col. (2004; 2006) y ligeramente inferiores a los obtenidos por Horita y col. (2011) en cocidos reducidos en grasa, cuyo pH fue de 6,46. Jiménez Colmenero y col., (2003) y Cofrades y col., (2004; 2006) indicaron que el pH de los productos cárnicos cocidos no varía significativamente, mientras no se modifique el porcentaje de proteínas.

En relación con la **capacidad de retención de agua** (CRA), no se obtuvieron diferencias significativas entre las hamburguesas control y las enriquecidas en calcio, situándose los valores entre 36,0%-39,0%. Sin embargo, al comparar las hamburguesas con sal y sin sal, la CRA fue superior en los lotes con NaCl, registrándose un valor medio del 45.72%. Esta diferencia se debe a que el ión Cl⁻ cambia las cargas de las proteínas y causa una repulsión entre las mismas que favorece la interacción con el agua (Ruusunen y Poulanne, 2005; Cheng y Da-Wen, 2008). La incorporación de sales de calcio a las hamburguesas con sal no modificó la CRA.

En los embutidos cocidos, ni la CRA ni el **extracto seco** presentaron diferencias significativas entre el lote control y los enriquecidos, siendo los resultados obtenidos, similares a los descrito por Yang y col. (2007) en salchichas reducidas en grasa y por Ayo y col., (2008) en salchichas enriquecidas con nueces en polvo.

En los madurados, tampoco se apreciaron grandes diferencias en el extracto seco ya que todos los lotes oscilaron entre 58,21-61,44%. Igualmente, estos valores se encuentran dentro de los descritos por otros autores en productos cárnicos madurados (Ordóñez y col., 1999; Herrero y col., 2007; Stollewerk y col., 2011). Calvo y col., (2008) estudiaron salchichones enriquecidos con licopeno y determinaron un extracto seco que oscilaba entre 59,56% y 61,40%. Estos datos indican que las sales de calcio, a las cantidades ensayadas, no influyen de forma importante en este parámetro. Sin

embargo, Flores y col., (2005) trabajaron con salchichones enriquecidos con cloruro cálcico, obteniendo valores de extracto seco de 38-40% y de humedad de 60-61%%. Estas diferencias se deben a que las condiciones de maduración han sido diferentes.

Tampoco se observaron diferencias entre los **recuentos microbiológicos** de los distintos lotes de los embutidos madurados. Tras el proceso de maduración. Los valores obtenidos fueron del orden de 10^{10} ufc/g en medio PCA, de 10^9 ufc/g en MRS y de 10^6 ufc/g en MSA. Estos resultados se encuentran entre los descritos por Ordóñez y col., (1999); Mendoza y col. (2001); Ammor y Mayo, 2007; Gurbuz y col., (2009), Salazar y col. (2009), Galán y col. (2011^b). La similitud de resultados está relacionada con el cultivo iniciador empleado para la fabricación de los salchichones, que como se ha mencionado previamente, estaba compuesto por *Staphylococcus carnosus* y *Lactobacillus sakei*. En este sentido, Zhang y col., (2010) destacan la importancia de las LAB para asegurar la correcta maduración de estos productos. Igualmente, Flores y col., (2005) incorporaron cloruro cálcico a productos madurados y obtuvieron los mismos recuentos tras 35 días de maduración.

La utilización de cultivos iniciadores es una práctica habitual en la industria cárnica. La incorporación de bacterias seleccionadas, sobre todo bacterias lácticas, permite una correcta acidificación y una seguridad alimentaria que permite ofrecer al consumidor un producto seguro y normalizado, algo que es muy importante para una industria desde el punto de vista comercial.

En nuestro caso era fundamental la normalización del producto ya que era indispensable asegurar que los productos madurados fueran siempre iguales y que la única variación se debiera a la sal cálcica incorporada, bien al tipo o a la cantidad. La escasa variación en los resultados obtenidos indican que el cultivo iniciador ha gobernado el proceso de maduración y que la presencia de las sales de calcio, no son capaces de modificar los parámetros físicoquímicos y microbiológicos.

5.1.3. Color

El color es uno de las características más importantes de cualquier alimento al ser la primera información que recibe el consumidor (Ling y col., 1996) y cualquier modificación del color hace que el producto sea rechazado, lo que supone importantes pérdidas. Por ello, la industria alimentaria cuida con esmero el color para ofrecer a los consumidores productos con características adecuadas (Bloukas y col., 1999) y

cualquier mejora asociada a su mantenimiento deberá ser estudiada y potenciada. (Mancini y Hunt, 2005; Xia y col., 2008).

Como se describe en el Capítulo de Material y Métodos los cambios en el color fueron analizados dentro del espacio CIEL*a*b*, determinando los parámetros de luminosidad (L*), rojo-verde (a*), amarillo-azul (b*), Ángulo Hue (Tonalidad), Índice de Saturación (Vivacidad) y ΔE (percepción global del color).

Cuando se elaboraron las hamburguesas, se observó que las enriquecidas con las mayores cantidades de GC presentaban un importante cambio de aspecto. Esta sal cristalizó dando lugar a numerosos cristales blancos visibles a simple vista y que modificaron la apariencia externa del producto, alejándolo de la que el consumidor está acostumbrado a encontrar. Por ello se consideró que este lote no tenía la calidad adecuada y se descartó para estudios posteriores. Cuando se incorporaron cantidades inferiores (20% IDR), los cristales que se formaron eran más pequeños, menos perceptibles y sobre todo tras el cocinado por lo que se consideró que los lotes GC20 podían seguir dentro del estudio.

La cristalización de cualquier compuesto químico está relacionada con su higroscopicidad o con su grado de saturación en el medio. En el primer caso, al captar agua, la movilidad de las moléculas facilita su reorganización y la formación de un cristal; en el caso de las hamburguesas, el contenido de agua se sitúa en torno al 75%, cantidad suficiente para permitir el movimiento de las moléculas de sal y, en consecuencia su reorganización para formar un cristal. En el segundo, la sobresaturación se produciría, en el caso concreto de esta sal, por la cantidad que fue necesaria añadir para alcanzar el porcentaje de la IDR de calcio requerido. Téngase en cuenta que la cantidad de GC añadida fue mayor que la de LC o CMC. Independientemente de la causa de la cristalización, el resultado fue negativo y desaconseja la utilización de esta sal a las mayores cantidades ensayadas.

En términos generales, el color fue muy similar entre los lotes control y los enriquecidos en calcio, independientemente del tipo y concentración de sal añadida. Este hecho se observó en los tres tipos de productos cárnicos elaborados.

La mayor **luminosidad (L*)** se observó, en los lotes enriquecidos con LC a las mayores concentraciones, aunque no hubo diferencias significativas en relación al control. Es importante recordar que estos lotes fueron los que mostraron los valores

más bajos de pH. La relación entre el color y pH está ampliamente demostrada (Kim y col., 2006) y algunos autores como Mancini y Ramanathan (2008) y Nair y col. (2014) indican que la relación es más estrecha cuando se utilizan lactato. El lactato, *per se*, al ser sustrato de la lactato deshidrogenasa, puede favorecer la formación de un medio reductor que mantiene el equilibrio redox de la mioglobina y en consecuencia, su estabilidad (Mancini y Ramanathan, 2008). Kim y col., (2006) proponen además, que el lactato juega un papel indirecto en la estabilidad del color al generar NADH que subsecuentemente es utilizado para mantener las formas reducidas de la mioglobina.

Las hamburguesas con NaCl no se diferenciaron significativamente de su control, independientemente del tipo y sal cálcica añadida. Cuando se compararon con las hamburguesas sin NaCl, se apreciaron importantes diferencias ($p < 0,05$) que permitieron agrupar a los dos tipos de hamburguesas (con y sin sal) en dos “clusters” diferentes en los que, los resultados más favorables se presentaban en el cluster que agrupaba los lotes elaborados con sal. Se ha descrito ampliamente el papel del NaCl en los cambios de color de la carne, que se relacionan con su actividad prooxidante que favorece cambios químicos en la mioglobina que afectan fundamentalmente a los parámetro a^* y L^* (Mancini y Hunt, 2005; Sørheim y col., 2009).

En el caso de los productos cárnicos cocidos, el comportamiento de L^* fue diferente ya que la luminosidad en el lote control fue inferior a la de los lotes enriquecidos. La diferencia puede deberse tal y como describieron Joshi y Brimelow (2002), a la interacción entre las partículas de la sal cálcica con la luz, y así, cuando la luz incide en ellas, se refleja y se traduce en una mayor luminosidad, Este mismo comportamiento ha sido descrito también por Viuda y col. (2010) en mortadelas enriquecidas con fibra, quienes indicaron que la incorporación de fibra favorecía la formación de espacios entre los componentes del producto, permitiendo que la luz cuando incidiera, se reflejase.

En el caso de los embutidos madurados, los valores que se obtuvieron fueron muy similares a los del control excepto a los elaborados con CMC que, mostraron valores significativamente más bajos ($p < 0,05$). Gimeno y col. (2001) obtuvieron los mismos resultados en productos cárnicos con sales de calcio como sustitutos de NaCl, si bien hay que tener en cuenta que las cantidades incorporadas por estos autores son mucho menores de las que se han utilizado en este trabajo.

Estos resultados nos permiten concluir que cualquiera de las sales de calcio ensayadas podrían ser utilizadas para enriquecer hamburguesas, excepto el GC al 30% de la IDR, ya que las diferencias de color se deben fundamentalmente a la adición de cloruro sódico.

El **parámetro a***, es el más importante para cualquier tipo de producto cárnico ya que la carne se asocia a un color rojo intenso y brillante propio de la mioglobina y que el consumidor asocia con la calidad.

En términos generales, el parámetro a* se comportó de forma muy similar en todos los productos cárnicos cuando se comparaban los lotes enriquecidos con su correspondiente control. En el caso de las hamburguesas, la única excepción fue el lote CMC30 que mostró el valor más bajo en las hamburguesas elaboradas sin y con NaCl ($p < 0,05$).

En los productos cárnicos cocidos, el parámetro a* fue muy similar en todos los lotes con excepción de los elaborados con GC a las mayores concentraciones ya que, en estos lotes, se evidenciaron los cristales blancos mencionados anteriormente y que desaconsejaron su utilización en el enriquecimiento de estos productos cárnicos.

Mención especial hay que hacer al comportamiento observado en los embutidos madurados; en los lotes enriquecidos con LC el valor del parámetro a* fue superior al de los restantes lotes con diferencias significativas. Esta diferencia se debe, como se ha explicado anteriormente, a la formación de ácido láctico a partir de esta sal cálcica que modifica el estado químico de la mioglobina favoreciendo la formación de nitrosomioglobina, dando lugar al color rojo característico de este tipo de productos (Fernández y col., 2007). Además, en los productos madurados el proceso de fermentación generado por las bacterias lácticas favorece la formación de un medio reductor en el que se pueden desarrollar las reacciones del curado con la consiguiente formación de este pigmento (Ordóñez y col., 1999). La presencia de cristales de GC fue menos evidente que en los otros dos productos cárnicos, sobre todo que en las hamburguesas. Esto puede deberse a que el GC se ioniza por la bajada del pH que tiene lugar durante la fase de fermentación, rindiendo calcio y ácido glucónico que no cristaliza o lo hace de forma menos intensa.

Al estudiar el **parámetro b*** tampoco se observaron diferencias significativas entre los lotes enriquecidos y sus controles, ni en las hamburguesas (con y sin sal) ni en

los productos cárnicos madurados. Sørheim y col., (2009) estudiaron carne de ternera con sal y almacenada en un ambiente de oxígeno controlado y tampoco observaron modificaciones en el parámetro b^* . De acuerdo con Mancini y Hunt (2005), este parámetro alcanza menos importancia en la carne ya que los colores que representa (azul-amarillo) no son típicos ni están tan relacionados con la carne como el parámetro a^* que se corresponde con el color rojo típico del pigmento de la mioglobina.

Sin embargo, en los cocidos, los valores de b^* fueron ligeramente superiores en los lotes enriquecidos con GC y LC, principalmente a las mayores concentraciones ($p < 0,05$). En otros trabajos realizados en mortadelas, como el descrito por Horita y col. (2011), quienes añadieron cloruro cálcico a la matriz cárnica, como sustitutivo de NaCl, tampoco observaron diferencias significativas en ninguno de los parámetros del color estudiados.

Cuando se cocinaron las hamburguesas, quedaron todas con el mismo color, el marrón pardo característico de los compuestos generados en la carne por la reacción de Maillard. De forma paralela, por encima de 50°C se produce la desnaturalización de la miosina que al coagular da una opacidad a la muestra que contribuye a que todos los lotes queden del mismo color (Thornberg, 2005). Dicha opacidad es mayor cuando el producto alcanza una temperatura interna de 45°C a 65°C (Pakula y Stamminger, 2012).

El ángulo Hue y el Índice de Saturación, al estar relacionados con los parámetros primarios, se comportaron de una forma similar a ellos en todos los productos elaborados, sin apreciarse grandes diferencias entre los lotes control y los enriquecidos.

Para examinar las diferencias reales entre los parámetros de color y la percepción visual, se ha desarrollado el parámetro ΔE que establece una relación euclídea entre los parámetro del CIEL $^*a^*b^*$, de tal forma que si ΔE es superior a 2 se considera que los cambios de color se pueden apreciar a simple vista. Valores inferiores indican que no se perciben estas diferencias (Savadkoobi y col. 2014).

Al determinar este parámetro en las hamburguesas se observó que todos los lotes podían percibirse como diferentes (>2), salvo el GC20 y el CMC20 ($1,22 \pm 0,18$ y $1,90 \pm 0,25$; respectivamente) que obtuvieron valores <2 . En los cocidos, al igual que en los madurados, todos los lotes presentaron valores inferiores. Estos resultados indican

que la adición de cualquiera de las sales y a las dosis utilizadas, la diferencia con el control puede ser perceptible a simple vista.

5.1.4. Textura

El Análisis de Perfil de Textura (ensayo de doble compresión) es uno de los más empleados por aportar la información más completa sobre las características de textura de cualquier alimento y, por tanto, es uno de los más utilizados cuando se quiere conocer el efecto de la incorporación de ingredientes en los alimentos, tanto aditivos, por ejemplo, o como en este caso, ingredientes funcionales.

En términos generales se puede decir que la textura fue muy similar entre los productos enriquecidos y el control correspondiente.

En el caso de las hamburguesas, la textura se estudió tras el cocinado con el fin de determinar la percepción del consumidor. La incorporación de LC y CMC, a las mayores concentraciones ensayadas, resultó en una mayor dureza significativamente diferente en relación con el control. Esto puede deberse a que el calcio, un ion divalente, establece enlaces entre las proteínas parcialmente desnaturalizadas durante el cocinado, favoreciendo la formación de un gel (Thornberg, 2005; Damodaran, 2008). Al añadir NaCl la dureza aumentó en relación a las hamburguesas sin sal. En este sentido, Desmond (2006; 2007) y Weiss y col., (2010) indican que la presencia de NaCl facilita la solubilización de las proteínas miofibrilares y así, durante el cocinado, estas proteínas aparecerían en mayor concentración y se dispondrían alrededor de la superficie de carne picada. El calentamiento produciría unos exudados que gelificarían y modificarían la textura del producto cocinado. El resto de los parámetros no cambiaron de forma significativa por la presencia de las sales.

Para abordar el estudio de los resultados obtenidos en los productos cárnicos cocidos y madurados, es importante tener en cuenta que presentan una estructura muy diferente a la de un producto fresco. Ambos son matrices cárnicas complejas que surgen de un picado más o menos intenso de la carne, alcanzando tamaños de partícula diferentes en función del tipo de producto y a veces muy pequeños, prácticamente imperceptibles como en el caso de las pastas finas utilizadas en la elaboración de productos cocidos. En este caso, el intenso picado conlleva un intenso triturado de las fibras musculares y una exposición de las proteínas miofibrilares al medio que les rodea. Las especias y aditivos que se incorporan a la carne picada son

indispensables para la extracción de estas proteínas y sobre todo el NaCl que desempeña un papel fundamental, ya que las proteínas miofibrilares son halosolubles. Aunque el aspecto es radicalmente diferente, la estructura de ambos tipos de productos es la misma, un gel proteico. Sin embargo se origina de distinta manera.

En el caso de los productos cocidos la formación del gel se produce con la aplicación del tratamiento térmico que conlleva la desnaturalización de las proteínas y su organización en una red tridimensional. De forma paralela, el tratamiento térmico consigue la higienización del producto. Los geles así formados son firmes, estables, confieren a estos productos su textura característica y permiten un perfecto loncheado a lo largo de su vida útil (Damodaran, 2008).

En los productos madurados, la desnaturalización proteica se produce por un descenso de pH. La firmeza de un gel es dependiente del valor alcanzado en el producto final y así, a mayor acidez, la desnaturalización proteica es mayor y los geles resultantes serán, por tanto, firmes y consistentes. La utilización de un cultivo iniciador, asegura que la acidificación va a estar normalizada y resulta más fácil relacionar la presencia o ausencia de las sales añadidas con los cambios observados en esta cualidad. También es importante tener en cuenta que en estos productos madurados, el picado de la carne es menos intenso con lo que el tamaño de partícula es mayor y, por tanto, la cantidad de proteína expuesta es menor lo que redundará siempre en que los geles así obtenidos presenten una firmeza menor que la que presentan los productos cárnicos cocidos (Ordoñez, 1998).

Los resultados obtenidos en los productos cocidos, mostraron pocas diferencias entre los lotes independientemente de la sal cálcica empleada o la cantidad añadida. En este tipo de productos, como se ha mencionado previamente, la mezcla de especias asegura la firmeza del gel cárnico lo que se traduce en cambios mínimos en los parámetros de textura. No obstante, un Análisis de Componentes Principales, recogiendo el 71% de la variabilidad, permitió agrupar los lotes en función del tipo de sal incorporada. Similares resultados han sido descritos previamente por Galán y col. (2011^a) en mortadelas enriquecidas con ácido fólico. Por el contrario, Horita y col. (2011) observaron que la adición de CaCl_2 a las mortadelas, conllevó una mayor dureza y masticabilidad de los lotes. Estos autores indican que posiblemente es debido a las interacciones entre los componentes de la matriz cárnica que repercuten en las propiedades de la textura. En este sentido, proponen que los iones Cl^- pueden causar

una acidificación del medio, que provoque una retracción del gel y por ello un incremento de la dureza.

En el caso de los productos madurados tampoco se observaron grandes diferencias con la excepción de los lotes elaborados con las mayores concentraciones, en los que se observó una menor dureza que resultó significativa en el caso del GC. Este hecho se relacionó con la cristalización del GC aunque, como se ha comentado anteriormente, fue menor que en el caso de los productos frescos y cocidos. Es muy probable que los cristales que se forman interfieran con la propia estructura del gel, dificultando la formación de la red tridimensional completa y haciendo que el producto resulte, en definitiva más blando.

Los resultados obtenidos son similares a los descritos por Grigelmo y col., 1999 quienes indicaron que la incorporación de cualquier ingrediente funcional, puede afectar a las propiedades de textura. Similares consideraciones hicieron Gimeno y col. (1999) en “chorizo de Pamplona” con CaCl_2 . Daengprok y col. (2002) al enriquecer productos madurados con lactato cálcico procedente de cáscara de huevo, sugieren que la máxima cantidad a añadir de calcio, fuese de 150 mg/100g de producto, para evitar alteraciones en la textura de los productos elaborados y Salazar y col. (2009), ya mencionaron que se ve comprometida la textura de los productos fermentados, cuando se supera un enriquecimiento en la IDR de más del 30%.

Para completar los estudios de textura, se llevó a cabo un Análisis del Corte en donde se determinaron los parámetros de fuerza y trabajo de Corte. En los tres tipos de productos enriquecidos se observó el mismo comportamiento que en el análisis de doble compresión; las diferencias fueron muy pequeñas y las que había, estaban relacionadas con la cantidad más que con el tipo de sal añadida.

Son pocos los estudios que recogen el análisis del corte en productos cárnicos, pero cabe recordar que mide fundamentalmente la dureza y la cohesión por lo que era de esperar un comportamiento similar al obtenido, en todos los casos, en el Análisis de Perfil de Textura. Cáceres y col. (2006) también observaron un ligero aumento del trabajo de corte en mortadelas enriquecidas con distintos ingredientes funcionales (fibra, ácidos grasos poliinsaturados n-3) más evidente cuando aumentaba la concentración de ingrediente incorporado, mientras que Daengprok y col. (2002) describieron en productos madurados, unos resultados similares a los obtenidos en

este trabajo, ya que la incorporación de LC no influía en la fuerza de corte, mientras que por el contrario, el polvo de la cáscara de huevo (como fuente de calcio), sí, incluso también en el trabajo de corte.

5.1.5. Análisis sensorial

El análisis sensorial es, sin duda, uno de los estudios más interesantes que se pueden hacer en el desarrollo de cualquier nuevo alimento ya que no se puede olvidar que, por muy sano y nutritivo que sea, su aceptación en el mercado va a depender de la calidad sensorial. Recordemos que una de las premisas de un alimento funcional es que tiene formar parte de la dieta habitual y, si no es agradable su sabor, por ejemplo, el consumidor terminará rechazándolo y derivando la ingesta del compuesto bioactivo a otras vías “más agradables”.

En el presente trabajo, la calidad sensorial se evaluó a través de un Análisis Hedónico y un Análisis Preferencial. A continuación se muestran la influencia de las sales de calcio en los parámetros sensoriales de los productos cárnicos.

En el caso de los productos frescos, primero se hizo un Análisis Descriptivo Cuantitativo con las hamburguesas crudas para conocer cuál sería la influencia, si la hubiese, de las sales de calcio en el aspecto visual con respecto a un lote control que equivaldría a una hamburguesa comercial. Se pudo observar que solo el lote LC30 superó la puntuación del control (3 puntos). Este lote fue uno de los que presentó un valor más alto del parámetro L* y del Ángulo Hue, lo que, indudablemente, influyó en la valoración de los panelistas. La puntuación del resto de los lotes quedó por debajo del control.

Sin embargo, cuando se incorporó la sal, la valoración cambió radicalmente ya que todos los lotes fueron puntuados más altos que los elaborados sin sal y, los lotes enriquecidos obtuvieron una puntuación mayor que su propio control con sal, excepto el lote GC20, que no alcanzó la puntuación establecida como referencia (3). Este hecho parece indicar la existencia de un efecto sinérgico entre el cloruro sódico y las sales de calcio que hace que los panelistas consideren mejor el aspecto visual de este tipo de hamburguesas.

Tras el cocinado a la plancha, se hizo un Análisis Hedónico. Los resultados mostraron que las mayores variaciones se encontraron en el sabor; así, los panelistas

valoraron el sabor del lote control con una puntuación mayor que cualquiera de los lotes enriquecidos; los panelistas indicaban en sus comentarios, unos matices sápidos ligeramente ácidos o metálicos. Sin embargo, de nuevo la incorporación de NaCl cambió totalmente la valoración y todos los lotes obtuvieron puntuaciones significativamente superiores a las de los lotes sin NaCl ($p < 0,05$). Estos resultados indican que la presencia de sal común enmascara de forma importante los matices sápidos extraños descritos por los panelistas y que hacían descender la valoración de los lotes sin sal. En este sentido, Lawless y col. (2003) y Baublits y col., 2005 indicaron que la presencia de cationes divalentes como el calcio, pueden influir en el sabor de los productos y por tanto, en la puntuación dada por parte de los panelistas, por lo que se recomienda estudiar sensorialmente los productos elaborados, ya que el comportamiento de estos cationes, puede variar al incorporarse en otras matrices tal y como indicaron Keast y Breslin, (2002); Lawless y col. (2003); Baublits y col. (2005).

El sabor es el parámetro más importante a la hora de valorar la calidad sensorial de las hamburguesas y fue el parámetro que más influyó en la aceptabilidad general. De hecho, ambos se comportaron de forma similar. Sería recomendable que estos productos cárnicos frescos enriquecidos se comercializaran con una pequeña cantidad de NaCl para conseguir una aceptabilidad mayor.

La influencia del NaCl en el sabor es hoy en día indiscutible pero la ingesta de sodio asociada al consumo de sal hace que las autoridades sanitarias recomienden que se reduzca cada vez más. Este hecho sirvió de base al establecimiento en 2012 de un Convenio entre AESAN-CEDEARNE y AFCA de dos años de duración, para el desarrollo de un Plan de reducción de grasa y sal y que se enmarca en los objetivos de la Estrategia NAOS y en los de la Unión Europea.

Desde esa fecha, tanto la industria cárnica como los fabricantes de aditivos, han realizados diversas actuaciones para que los profesionales de sus sectores pudieran llevar a cabo, de forma voluntaria, la reducción de sal y grasa en sus productos y así poder ofrecer a partir del segundo semestre del año 2014 productos cárnicos con una composición de un 10% menos de sal y un 5% menos de grasa. El programa aún continúa. Así mismo, la propia AECOSAN advierte del peligro de la reducción excesiva de este ingrediente en la seguridad de los productos cárnicos ya que la sal supone una barrera para el crecimiento de una microbiota alterante y/o patógena (AESAN, 2010).

De acuerdo con los objetivos del mencionado convenio y al estar las hamburguesas elaboradas solo con un tipo de carne, la cantidad de sal a alcanzar sería de 1,6%, cantidad ligeramente superior a la utilizada en el presente estudio (1,5%) (http://www.microal.com/documentos/folleto_AECOSAN_CEDECARNE.pdf).

Nuestro trabajo se encuentra por lo tanto, dentro de estas recomendaciones.

En el caso de los productos cárnicos cocidos al realizar el Análisis Hedónico, todos los lotes obtuvieron una puntuación muy próxima al control. Es muy probable que en este tipo de productos, la escasa diferencia entre unos lotes y otros puede estar relacionada con las especias indispensables para su elaboración y que enmascaran los matices sápidos que puedan aportar las sales cálcicas. Esto ha sido descrito por Barat y Toldrá, (2011), en especias como pimienta, cebolla, ajo, tomate y pimentón dulce. Tan sólo el lote GC40 obtuvo una puntuación menor que 5. Como se ha mencionado anteriormente con esta sal se forman cristales que dan un aspecto negativo y se perciben en boca.

En el Análisis Preferencial los catadores no mostraron preferencia entre un lote u otro. Tan sólo se puede destacar que los lotes enriquecidos con CMC obtuvieron las mejores puntuaciones, siendo los más parecidos al lote control ($p>0.05$).

En los productos madurados, las puntuaciones más bajas se observaron en los lotes enriquecidos con GC mostrando puntuaciones por debajo de 5 en los parámetros de color, sabor y sobre todo en la textura a las concentraciones más altas, obteniendo una diferencia significativa en relación al control. La aceptabilidad general fue un reflejo de estos parámetros y los lotes con esta sal son los que obtuvieron las puntuaciones más bajas.

Con los datos obtenidos con la prueba hedónica, se hizo un Análisis de Componentes Principales en que se pudo confirmar estas diferencias entre los lotes. Se obtuvieron dos componentes que recogían el 89% de la variabilidad. Los lotes se agruparon en dos “cluster” claramente diferenciados. Uno de ellos incluía a los lotes enriquecidos con el GC y el otro, agrupaba a los lotes restantes, incluyendo al control.

Sin embargo, cuando se hizo el Análisis Preferencial, no se detectaron diferencias significativas. Este mismo comportamiento fue observado anteriormente en los productos cocidos.

La comparación entre los resultados obtenidos en las medidas instrumentales del color, concretamente en la determinación del parámetro ΔE y los resultados obtenidos tras el análisis sensorial son inconsistentes. El color no resultó ser uno de los parámetros más decisivos a la hora de valorar los productos cárnicos lo cual puede indicar que la diferencia entre el control y los lotes enriquecidos no era tan relevante como cabría pensar con los datos obtenidos en el ΔE .

En una escala típica, el valor de ΔE estará en el intervalo de 0 a 100 con la distribución de valores: $\leq 1,0$: no perceptible por el ojo humano; 1 - 2: perceptible a través de una estrecha observación; 2-10 perceptible a simple vista; 11 - 49: Los colores son más similares de lo contrario y, finalmente, 100: los colores son exactamente lo contrario (Artés y Minguez, 2002).

La disparidad de resultados nos haría tomar esta tabla como una guía general ya que considera los parámetros básicos pero no pondera correctamente otros parámetros importantes como el índice de saturación. Pequeñas variaciones en los valores de L^* , a^* y b^* , aunque no sean significativas, pueden repercutir de forma muy importante en el ΔE por lo que no debería considerarse un parámetro definitivo sino un parámetro útil y orientativo para aplicar en casos concretos y específicos.

Resumiendo lo anteriormente descrito, se puede decir que los mejores resultados se obtuvieron en los productos cárnicos enriquecidos con LC y CMC, tal vez, porque la cantidad necesaria para aportar el mismo porcentaje de la IDR del calcio, es menor que la necesaria para enriquecer con GC y por tanto, modifican menos las características sensoriales del producto final. Se puede decir también que las mayores cantidades de las sales de calcio (40%) son las que pueden comprometer más la calidad sensorial por lo que es necesario prestar atención a este factor a la hora de diseñar los diferentes productos cárnicos.

5.2. Bioaccesibilidad del calcio

El estudio de la bioaccesibilidad de un ingrediente bioactivo es fundamental a la hora de desarrollar cualquier alimento funcional ya que permite conocer el comportamiento de un compuesto bioactivo durante la secuencia de eventos que tiene lugar en el proceso de digestión y establecer en qué medida puede ser transportado a través de las células del epitelio intestinal y asimilado por el organismo. No hay que

olvidar que entre los factores que más influyen en la bioaccesibilidad se encuentran la naturaleza química del compuesto y la composición del alimento (Cámara y col., 2007; Cilla y col., 2012). En este apartado se van a discutir los principales resultados que se han obtenido en este sentido, que van a permitir valorar cual es la sal más adecuada para enriquecer un producto cárnico y a la vez, cuál es el producto más adecuado para vehicular este ingrediente funcional.

La bioaccesibilidad se estudió por dos métodos *in vitro*. El primero de ellos fue el método de diálisis que simula la absorción intestinal mediante el paso del digerido gástrico a través de una membrana de diálisis de diámetro de poro conocido. Se eligió primero este método por ser más asequible, fácil y rápido de llevar a cabo y aportar una primera información sobre el comportamiento de los nutrientes, en este caso el calcio, durante el proceso de digestión (Fernández-García y col., 2009). El segundo método fue un ensayo con cultivos celulares, concretamente la línea celular Caco-2, que son células cuyo comportamiento es muy parecido al de las del epitelio intestinal. El matiz biológico de este ensayo hace que los resultados que se obtengan se aproximen más a lo que ocurre durante el proceso de digestión gastrointestinal y aporten una información más próxima a la realidad.

Los estudios de bioaccesibilidad se realizaron en los lotes enriquecidos con las mayores concentraciones de las sales cálcicas que rindieron los mejores resultados: LC y CMC. Así mismo, a nivel metodológico, el uso de las mayores concentraciones permitía una mayor facilidad a la hora de determinar las cantidades de calcio. Los lotes enriquecidos con GC se desestimaron porque presentaron el peor comportamiento tecnológico y la peor valoración sensorial. En el caso de los productos cárnicos frescos, la bioaccesibilidad se determinó tras el cocinado a la plancha.

5.2.1. Contenido en calcio

Para realizar los estudios de bioaccesibilidad fue imprescindible determinar el contenido en calcio presente en todos los productos seleccionados para el estudio de bioaccesibilidad.

La Tabla 6 muestra los valores expresados en mg/100g de producto. En términos generales los valores se corresponden a los esperados, en función de la cantidad añadida. En los productos frescos, fue ligeramente más alta, en torno a un 20%; esto probablemente se debe a la pérdida de agua que tiene lugar durante el cocinado y que

contribuye a su concentración (Pan y Shing, 2001). Estos autores establecieron que las pérdidas de agua durante el cocinado de carne de vacuno picada a 60°C durante 2 minutos, estaba en torno a 15-20%.

Tabla 6: Contenido en calcio (mg/100g) de los productos cárnicos seleccionados para el estudio de bioaccesibilidad.

	LC30	LC40	CMC30	CMC40
Productos cárnicos frescos (hamburguesa)	336,29		361,85	418,51
Productos cárnicos cocidos (mortadela)	304,80	473,06	317,64	436,85
Productos cárnicos madurados (salchichón)	311,52		301,43	

En el ensayo con células Caco-2, se determinó también el calcio presente en la leche utilizada como control y se obtuvieron valores de $122,60 \pm 14,76$ mg / 100 g de producto.

En cualquier caso, se consideró que la cantidad de calcio determinada en todos los productos fue suficiente para alcanzar los niveles de calcio propuestos en el objetivo de este trabajo.

5.2.2. Bioaccesibilidad del calcio por el método de diálisis

Para este estudio se utilizó el método *in vitro* estático basado en el descrito por Hazell y Johnson (1987) y mejorado por Wolfgor y col., (2002) y Oomen y col, (2003). Los digeridos obtenidos tras la fase gástrica se incubaron en agitación con una solución de pancreatina-bilis controlando los parámetros físico-químicos (pH, temperatura, agitación) y simulando así la fase intestinal. Posteriormente, el digerido final se somete a un proceso de diálisis en el que la absorción intestinal se simula mediante el paso de los nutrientes del digerido a través de la membrana de diálisis cuyo tamaño de poro es el suficiente para que el nutriente a estudiar, en este caso el calcio, pueda pasar a su través.

Tabla 7: Bioaccesibilidad del calcio (%) a partir de los productos cárnicos enriquecidos, utilizando el método de diálisis

	Lactato cálcico	Citrato-malato cálcico
Productos cárnicos frescos	7,73	14,55
Productos cárnicos cocidos	9,94	8,23
Productos cárnicos madurados	10,54	9,47

En la Tabla 7 se recogen de forma integrada los resultados obtenidos por el método de diálisis. El porcentaje de bioaccesibilidad está calculado como la relación entre el calcio dializado (el que quedaría disponible para su absorción) y el presente en la muestra original (producto cárnico).

En los productos cárnicos frescos, la fase gástrica contenía la práctica totalidad del calcio presente en la muestra original, lo cual indica que el calcio se libera totalmente de la carne picada durante el proceso de digestión.

En los lotes enriquecidos con LC, la cantidad de calcio dializado (28,84 mg/100 g producto) fue inferior al 10% del Ca detectado en la fase gástrica (363,95 mg/100 g producto) lo cual implica una pérdida importante. Este calcio que queda atrapado en la parte sólida resultante de la digestión gástrica (solid delivery), se correspondería al Ca que se eliminaría con las heces. En los lotes enriquecidos con CMC, el calcio dializado fue el doble que el detectado con el LC (55,66 mg/100 g producto) lo cual supone, en un principio una mayor dializabilidad y, en consecuencia, bioaccesibilidad. Así, de un porcentaje de bioaccesibilidad del 7,73 en el caso del LC, se pasó a 14,55 en el caso del CMC. El residuo sólido sería de 171,29 mg en el LC y de 129,12 mg en el CMC, lo que supone una pérdida del Ca de 47% y 34% respectivamente.

La diferencia observada entre las dos sales puede deberse a su comportamiento durante el cocinado. En los dos casos, como se ha descrito anteriormente, las sales de calcio contribuyen a la formación de un gel proteico más firme al interferir con las proteínas y formar una red tridimensional más intensa. Es probable que en el caso del

LC, al producir un descenso superior del pH, forme una red más compacta y dificulte la liberación de Ca durante el proceso de digestión.

Los resultados obtenidos en los productos cárnicos cocidos y madurados siguieron un comportamiento similar y, a su vez, diferente al de los productos frescos. No hay que olvidar que ambos tipos de productos tienen la misma estructura, son geles y la red tridimensional que se forma es similar, independientemente de cuál sea su origen: el calor o la acidez.

En el caso de los productos cocidos, la fase gástrica recoge prácticamente el 90% del contenido de Ca en la muestra. El calcio dializado detectado a partir de los lotes enriquecidos con LC (47,92 mg/100 g) fue ligeramente superior al detectado en los lotes con CMC (35,95 mg/100 g). Los porcentajes de bioaccesibilidad fueron muy similares, del 9,94% y 8,23%, respectivamente. El residuo sólido resultante fue de 291,96 mg en los lotes con LC y de 280,97 mg en los de CMC, lo que supone una pérdida del Ca de 68% y 70% respectivamente.

En los productos madurados, la cantidad de calcio en la fase gástrica fue inferior al 40% del contenido de Ca en la muestra. Este bajo porcentaje puede estar relacionado con la complejidad de la matriz y es posible que las enzimas gástricas no sean capaces de digerir el producto de forma completa, lo que evita la total liberación del Ca que quedaría en la parte sólida y se eliminaría con las heces. El calcio dializado obtenido a partir de los lotes enriquecidos con LC (55,93 mg/100 g) fue muy similar al detectado en los lotes con CMC (55,78 mg/100 g). Los porcentajes de bioaccesibilidad fueron igualmente muy similares, del 10,54% y 9,47%, respectivamente. El residuo sólido resultante fue de 55,93 mg en los lotes con LC y de 55,98 mg en los de CMC, lo que supone una pérdida del Ca de 56% y 59% respectivamente.

5.2.3. Bioaccesibilidad del calcio utilizando la línea celular Caco-2.

Las células Caco-2 fueron desarrolladas por Sloan-Kettering Institute for Cancer Research (Nueva York, Estados Unidos) y se caracterizan por su gran facilidad de diferenciación espontánea, por presentar en su mayoría bordes en cepillo y por desarrollar receptores de factores de crecimiento y numerosas enzimas con actividad metabólica determinada lo que les hacen adquirir las características morfofuncionales del enterocito maduro (Le Ferrec y col., 2001, Fossati y col., 2008, Smetanová y col., 2011).

Los lotes seleccionados para el estudio fueron los elaborados con las sales con las que se habían obtenido los mejores resultados tecnológicos y sensoriales y a las mayores concentraciones: CMC30 y LC30 para cocidos y madurados; en el caso de productos cárnicos frescos se decidió fabricar un lote con CMC40 debido a los buenos resultados sensoriales que se habían obtenido con el lote CMC30. Para este tipo de ensayo, se utilizó como control leche entera UHT ya que la leche es la principal fuente de calcio en la dieta y, además, se considera el más biodisponible, por lo que fue usado como referencia.

El contenido en Ca detectado en los productos enriquecidos fue el esperado en función de la cantidad añadida, pero en la fase gástrica, el contenido de calcio fue diferente dependiendo del tipo de productos. Así, en las hamburguesas, se recuperó la práctica totalidad (96-98%) del Ca añadido, mientras que en los productos cocidos, sólo se recuperó la mitad (aprox. 60%) y en los madurados, la tercera parte, en torno al 35%. En la muestra de leche, la fase gástrica contenía el 75% del calcio inicial presente en la muestra.

De acuerdo con la metodología desarrollada en este apartado, el digerido gástrico se sometió a una centrifugación que simularía la fase intestinal, tras la que se obtuvieron dos fases. Una fase líquida (sobrenadante) que contendría el Ca que quedaría disponible para su absorción y un sedimento en el que se encontraría el residuo sólido con el calcio que no se ha liberado.

En el caso de las hamburguesas el Ca presente en el sobrenadante (Ca disponible), se situó en torno al 40% del detectado en la fase gástrica, en los productos cocidos, en torno al 20 %, muy similar al obtenido en la leche y más bajo en el caso de los madurados en los que se detectó una cantidad en torno al 10%. Estos valores se detectaron en ambos tipos de sales.

Este sobrenadante se diluyó adecuadamente hasta conseguir la mayor concentración de Ca que resultase no tóxica para las células. La toxicidad se estimó mediante la determinación de la resistencia transepitelial de las células en concentraciones de calcio que oscilaron entre 0 y 40 μM . Al obtenerse valores muy similares en todas las concentraciones ensayadas y con el fin de facilitar el estudio, se considero más adecuada la concentración de 40 μM . Esta dilución se inoculó en la cámara apical de los pocillos donde se encontraba la monocapa celular con una

resistencia transepitelial superior a los $1000 \Omega\text{cm}^2$ que aseguraban su viabilidad. Tras la incubación a 37°C , se aspiró el contenido de las cámaras basal y apical y se procedió a determinar el contenido en Ca por AAS.

La relación entre el contenido de Ca en las dos cámaras nos permitió conocer la eficacia del transporte que equivaldría a la bioaccesibilidad del Ca. Aunque este porcentaje fue ligeramente más alto para los productos cocidos (11,35% y 12,71% para LC y CMC, respectivamente; no hubo diferencias significativas con los productos frescos (9,98% y 9,85%, para las mismas sales) ni con la leche utilizada como control (9,75%). Tampoco influyó el tipo de sal cálcica. Sin embargo estos valores disminuyeron significativamente en los embutidos madurados alcanzando porcentajes de 6,75% para LC y 7% para CMC.

Los resultados obtenidos parecen indicar que la matriz cárnica es el principal factor limitante y, por tanto, cualquiera de las dos sales estudiadas podría ser utilizada para el enriquecimiento de productos cárnicos. A pesar de la variabilidad que introduce la matriz cárnica, los valores de bioaccesibilidad se sitúan en torno al 10%, incluso en la leche utilizada como control. Sin embargo, los productos madurados se perfilan como los menos adecuados para su enriquecimiento ya que la bioaccesibilidad del calcio es la más baja de todos los productos estudiados.

La validez de estos resultados está avalada por el coeficiente de permeabilidad aparente (Papp) que establece una relación entre la absorción de un determinado nutriente, en nuestro caso del Ca, a través de las células Caco-2 con la absorción en el intestino humano. De acuerdo con las indicaciones de los fabricantes del CacoReady kit utilizado, si el Papp es menor de 10^{-6} cm/s , el rango de predicción de absorción *in vivo* es bajo (0-20%), medio (20-70%) si el valor está comprendido entre 10^{-6} y $10 \times 10^{-6} \text{ cm/s}$ y la relación es alta (70-100%) si los valores superan los $10 \times 10^{-6} \text{ cm/s}$. El Papp obtenido en los productos cárnicos frescos estuvo en el rango superior, 70-100% mientras que en cocidos y madurados fue del 20-70%. Así pues, en el caso de las hamburguesas, se absorbería entre el 70-100% del calcio que llega a la membrana entérica.

La digestión de los alimentos es un proceso muy complejo en el que influyen múltiples variables que, en muchas ocasiones, están interrelacionadas. Factores como las condiciones de incubación, agitación, tiempo, pH o temperatura son muy

importantes, pero los más relevantes son la matriz del alimento y el tipo de nutriente así como su posible interacción con el resto de los componentes del alimento. Es evidente que la estructura de la matriz del alimento influye en la liberación, accesibilidad y estabilidad química de un determinado nutriente. Esto mismo ocurriría con el calcio objeto de nuestro estudio.

La dificultad de absorción de calcio ya ha sido descrita por numerosos autores quienes hacen referencia a la influencia de la matriz alimentaria y a otros factores como la fuente de calcio o la presencia de grasas, fitatos, taninos y oxalatos (Aarle y col., 1997; Gueguen y Pointillard, 2000; López-Huertas y col., 2006; Teucher y col., 2006; Frontela y col., 2009).

Haderslev y col. (2000), Dendougui y Schewedt (2004), Teucher y col., (2006), Van der Hee y col., (2009) y Abrams, (2010) indican que los numerosos factores que interfieren en la absorción del calcio, hacen que dicho porcentaje puede ser inferior al 10%, dando relevancia al hecho de que el Ca pueda quedar retenido en la matriz del alimento. Así mismo, este último autor autor indicó que la absorción del calcio no sólo depende de la fuente (en nuestro caso, sería del tipo de sal cálcica), sino de otros factores igualmente influyentes, como la ingesta diaria del mineral, factores genéticos y el nivel de vitamina D presente en el organismo. Dendougui y Schewedt (2004) también indicaron que el porcentaje de bioaccesibilidad del calcio varía con las interferencias no solo con los componentes de los alimentos, sino a ingredientes funcionales incorporados, como la fibra, describiendo también cómo la absorción puede ser inferior 10%, valor en el que se encuentran algunos de nuestros productos. López-Huertas y col. (2006) indicaron que el aumento de trifosfato cálcico favorece la bioaccesibilidad de calcio más que la presencia de caseinofosfopéptidos o fructooligosacáridos por lo que se propone como una sal útil para potenciar su absorción. Similares consideraciones hicieron Teucher y col., (2006). Guèguen y Pointillart (2000) y Cámara y col., (2007) indicaron que el contenido en proteína puede modificar también la absorción de Ca e informaron de que el aumento de proteína conlleva generalmente un aumento en la pérdida de Ca por orina.

Igualmente, Haderslev y col. (2000) y Van der Hee y col., (2009) indicaron que la presencia de algunos ácidos grasos, como el esteárico, reduce también la absorción del calcio ya que reaccionan con los cationes divalentes y dan lugar a jabones insolubles que no se absorben con facilidad en el tracto gastrointestinal. Nuestros resultados están

de acuerdo con estos autores ya que la bioaccesibilidad del calcio fue menor en los productos cocidos y madurados que son los que presentaron mayor contenido de grasa.

Si se comparan los resultados obtenidos en este trabajo con los descritos por otros autores en otros alimentos, encontramos una gran variabilidad. Así, ya Morrissey y Flynn, (1972) indicaron que la absorción de este mineral en leche de vaca variaba entre 21 y el 45%. Posteriormente, Recker y col. (1988) describieron que dicho porcentaje era del 21% al 26% en mujeres en edad menopáusica cuando tomaban productos lácteos enriquecidos con carbonato cálcico. Kruger y col. (2003) concluyeron que la bioaccesibilidad del calcio era similar en leches enriquecidas con carbonato cálcico o con calcio procedente de leche.

En un estudio llevado a cabo por Sittikulwitit y col. (2004) con diferentes sales cálcicas y leche en polvo, determinaron porcentajes de absorción entre 28,5 y 58,7%. Otros autores establecieron que la absorción de este mineral en fórmulas lácteas infantiles era del 39% (Nelson y col., 1996). En el estudio realizado por Van der Hee y col. (2009) se describió que la absorción oscilaba entre el 15 y el 44%, en helados enriquecidos con calcio. Shen y col., (1995) y Sarria, (1998) describieron un rango entre un 18% y un 21%, en leche.

Mesías y col., (2009) hicieron un estudio con dos grupos de adolescentes alimentados con dos dietas diferentes y determinaron que el porcentaje de absorción estaba en torno al 10 y el 15%. Son varios los autores que han estudiado la bioaccesibilidad del calcio a partir de zumos de frutas enriquecidos. Perales y col. (2005) describieron que el porcentaje de bioaccesibilidad del calcio era del 12,7% al 15,4% en zumos de frutas suplementadas con leche desnatada y cereales. Gonelli y col., (2007) determinaron un 29% en zumos de naranja enriquecidos. Cilla y col., (2011) obtuvieron valores similares, describiendo que la absorción de calcio variaba entre 10,47 a 19,82% en diferentes bebidas de frutas enriquecida.

Los valores de bioaccesibilidad obtenidos en el presente trabajo se encuentran dentro del rango de valores descritos y que se acaban de mencionar. La bioaccesibilidad del Ca en los productos cárnicos frescos fue similar a la de la leche utilizada como control. En el caso de las mortadelas, el porcentaje de bioaccesibilidad fue ligeramente superior al obtenido en la leche control lo que pudiera deberse al

Discusión Integradora

mayor contenido de proteínas tal y como se ha descrito anteriormente pero las diferencias observadas no fueron significativas. En el caso de los productos madurados la bioaccesibilidad fue notablemente inferior ($p < 0,05$).

Por todo lo anteriormente expuesto se puede decir que LC y CMC, son las sales más adecuadas para el enriquecimiento de productos cárnicos siendo posible su incorporación en cantidades que aporten entre el 30% y el 40% de la IDR.

El porcentaje de bioaccesibilidad varió ligeramente en función del método empleado. Con el método de diálisis los valores oscilaron entre 14,55% en los productos cárnicos frescos y el 7,73% en los madurados. Al emplear la línea celular Caco-2, la bioaccesibilidad osciló entre 12,71% y 6,75% para los productos cocidos y madurados, respectivamente. A pesar de la variabilidad de los datos la tendencia es similar y, en ambos métodos, los productos madurados presentaron la menor bioaccesibilidad.

Todo ello nos permite decir que los productos aquí diseñados podrían entrar en la categoría de *fuentes de calcio*, encontrándonos en consecuencia, con nuevos alimentos adecuados para vehicular en la dieta este nutriente esencial [Reglamento (CE) N° 1924/2006 del Parlamento Europeo].

Capítulo 6: CONCLUSIONES

Capítulo 6: Conclusiones

1. Es posible elaborar productos cárnicos enriquecidos con calcio. Con ellos se incrementaría la gama de alimentos ricos en este mineral presentes en el mercado y contribuiría a la mejora del estado de salud y bienestar.
2. Lactato cálcico y citrato-malato cálcico son las sales más adecuadas ya que con ellas se obtuvieron los mejores resultados desde el punto de vista tecnológico y sensorial. El gluconato cálcico no es una sal recomendable porque influye negativamente en la calidad sensorial.
3. Lactato cálcico y citrato-malato cálcico pueden incorporarse con buenos resultados en cantidades suficientes para que 100 g de producto aporten entre el 30-40% de la Ingesta Diaria Recomendada.
4. La bioaccesibilidad del calcio a partir de ambas sales cálcicas es muy similar. Las principales diferencias están relacionadas con el tipo de producto cárnico.
5. Los ensayos realizados con la línea celular Caco-2 mostraron que la bioaccesibilidad del calcio se encuentra en torno al 10% en productos frescos, 12% en cocidos y 7% en madurados.
5. Los productos cárnicos frescos y cocidos enriquecidos con CMC se perfilan como los más adecuados para vehicular calcio, ya que son viables tanto tecnológica como sensorialmente y la bioaccesibilidad es similar a la del calcio de la leche utilizada como control en este estudio (10%). Por el contrario, los productos cárnicos madurados se pueden considerar como los menos adecuados para el enriquecimiento con este mineral.
6. Los productos cárnicos frescos y cocidos desarrollados en este trabajo constituyen, en consecuencia, una nueva opción para incorporar calcio a la dieta. En base a lo estipulado en el Reglamento (CE) N° 1924/2006 del Parlamento Europeo, podrían considerarse como *fuentes de calcio*.

BIBLIOGRAFÍA

Bibliografía

- AAP (American Academy of Pediatrics) (1988). Committee on Nutrition. Clinical testing of infant formulas with respect to nutritional suitability for term infants. Elk Grove Village, IL, USA. Disponible en: <https://www.aap.org/en-us/Pages/Default.aspx>. (Acceso 12 Octubre 2015).
- Aarle C., Bontenbal E. y Potjewijd R.E. (1997). The dialysability of calcium, magnesium and iron as a method to compare *in vitro* bioavailability of minerals in foods. En: Book of Abstracts, Bioavailability '97. Wageningen, (Holanda).
- Abrams S.A. (2010). Setting dietary reference intakes with the use of bioavailability data: calcium. American Journal of Clinical Nutrition, 91 (suppl): 1474S-1477S.
- ADA Reports (2004). Position of the American Dietetic Association: Functional Foods. Journal of The American Dietetic Association, 104: 814-826.
- AESAN (2009). Agencia Española de Seguridad Alimentaria y Nutrición. Plan de reducción del consumo de sal. Estrategia NAOS. Disponible en: http://www.naos.aesan.msps.es/naos/ficheros/estrategia/Memoria_Plan_de_reduccion_del_consumo_de_sal_-_Jornadas_de_debate.pdf. (Acceso 26 Octubre 2015).
- AESAN (2010). Agencia Española de Seguridad Alimentaria y Nutrición. Informe del Comité Científico de la Agencia Española de Seguridad Alimentaria y Nutrición (AESAN) en relación al efecto de la reducción de la sal en la seguridad microbiológica de los productos cárnicos curados. Número de referencia AESAN 2010-010. Revista del Comité Científico nº 13. Pp.: 59-87.
- AESAN (2012). Agencia Española de Seguridad Alimentaria y Nutrición. Evaluación nutricional de la dieta española II. Micronutrientes Sobre datos de Encuesta Nacional de Ingesta Dietética (ENIDE). Ministerio de Sanidad, Servicios Sociales e Igualdad. Agencia Española de Seguridad Alimentaria y Nutrición. Disponible en: http://www.aesan.msc.es/AESAN/docs/docs/evaluacion_riesgos/estudios_evaluacion_nutricional/Valoracion:nutricional_ENIDE_micronutrientes.pdf. (Acceso 10 Octubre 2015).
- Aggett PJ. (2010). Population reference intakes and micronutrient bioavailability: a European perspective. American Journal of Clinical Nutrition, 91(suppl): 1433S-1437S.

Bibliografía

- Aguilar F., Autrup H., Barlow S., Castle L., Crebelli R., Dekant W., Engel K.-H., Gontard N., Gott D., Grilli S., Gürtler R., Larsen J.C., Leclercq C., Leblanc J.C., Malcata F.X., Mennes W., Milana M.-R., Pratt I., Rietjens I., Tobbacck P. y Toldrá F. (2007). Calcium citrate malate as source for calcium for use in foods for Particular Nutritional Uses and in foods for the general population. *The EFSA Journal*, 612: 1-24.
- Aleman M., Nuchi C.D., Bou R., Tres A., Polo J., Guardiola F. y Codony R. (2010). Effectiveness of antioxidants in preventing oxidation of palm oil enriched with heme iron: A model for iron fortification in baked products. *European Journal of Lipid Science and Technology*, 112(7): 761-769.
- Álvarez J. (2002). Prevención de la osteoporosis: El costo de la desinformación del paciente. *Economía de la Salud*, 1(4): 24-26.
- Álvarez-Hernández X., Nichols GM. y Glass J. (1991). Caco- 2 cell line: a system for studying intestinal iron transport across epithelial cell monolayers. *Biochimica and Biophysica Acta*, 1070: 205-208.
- Amaro M.A. y Cámara F. (2004). Iron availability: An updated review. *International Journal of Food Science and Nutrition*, 55(8): 597-606.
- Ammor M.S. y Mayo B. (2007). Selection criteria for lactic acid bacteria to be used as functional starter cultures in dry sausage production: An update. *Meat Science*, 76: 138-146.
- Anderson J.J.B. y Allen J.C. (1994). Nutrition of Macrominerals and Trace Elements. En: *Functional Foods*. (Ed.: I. Golberg). Chaoman and Hall. New York, USA. Pp: 323-354.
- Antequera M.T. y Tejeda J.F. (2001). Emulsiones y geles cárnicos. En: *Enciclopedia de la carne y los productos cárnicos Vol II*. (Ed.: S. Martín Bejarano). Ediciones Martín & Macías. Plasencia, España. Pp. 1268-1277.
- AOAC (2005) Official Method Dry Ash Method. AOAC International 2005.
- AOAC (2011) Official Methods of Analysis of AOAC International. 18th Edition.
- Ares G. y Gámbaro A. (2007). Influence of gender, age and motives underlying food choice on perceived healthiness and willingness to try functional foods. *Appetite*, 49(1): 148-158.
- Arihara K. (2006). Strategies for designing novel functional meat products. *Meat Science*, 74: 219-229.

Bibliografía

- Aronov W. (2011). Osteoporosis, osteopenia and atherosclerotic vascular disease. *Archives of Medical Science*, 7(1): 26-29.
- Arvanitoyannis I. y Houwlingen-Koukaliaroglou M. (2003). Implementation of chemometrics for quality control and authentication of meat and meat products. *Critical Reviews in Food Science and Nutrition*, 43 (2): 173-218.
- Artés F. y Mínguez M.I. (2002). Analysing changes in fruit pigments. En: *Colour and food*. (Ed.: B. Douglas). Woodhead Publishing in Food Science and Technology. Cornwall, Inglaterra. Pp.: 248-282.
- Ashwell M. (2002). Conceptos sobre los alimentos funcionales. ILSI Europe Concise Mongrap Series. Disponible en: <http://www.argenbio.org/adf/uploads/pdf/alimentosfuncionalesiLSI.pdf> (Pp.: 5-6). (Acceso 27 Octubre 2015).
- Ávila E., Barrera D. y Díaz L. (2007) Acciones calciotrópicas de la hormona paratiroidea y del sistema endocrino de la vitamina D. *Revista de Investigación Clínica*, 59(4): 306-317.
- Ayo J., Carballo J., Solas M.T. y Jiménez-Colmenero F. (2008). Physicochemical and sensory properties of healthier frankfurters as affected by walnut and fat content. *Food Chemistry*, 107: 1547- 1552.
- Bañuelos G., Stushnoff C., Walse S., Zuber T., Yang S., Pickering I. y Freeman J. (2012). Biofortified, selenium enriched, fruit and cladode from three *Opuntia Cactus* pear cultivars grown on agricultural drainage sediment for use in nutraceutical foods. *Food Chemistry*, 135 (1): 9-16.
- Barat J. M. y Toldrá F. (2011). Reducing salts in processed meat products. En: *Processed meats: Improving safety, nutrition and quality*. (Ed.: J.P. Kerry y J.F. Kerry). Woodhead Publishing Ltd. Cambridge, Inglaterra. Pp.: 331-345.
- Barrett K.E., Barman S.M., Boitano S. y Brooks H.L. (2010). Control hormonal del metabolismo de calcio y fósforo y fisiología de los huesos. En: *Ganong. Fisiología Humana*, 23ª edición. MacGraw-Hill. Nueva Cork, USA. Pp.: 363-377.
- Baublits R.T., Pohlman F.W., Brown A.H. y Johnson Z.B. (2005). Effects of sodium chloride, phosphate type and concentration, and pump rate on beef biceps femoris quality and sensory characteristics. *Meat Science*, 70: 205-214.
- Benkouider C. (2004). *Functional Ingredients Magazine-Nutrition Science, Innovation*. NewHope360. Obtenido de *The world's emerging markets. Functional Foods and*

Bibliografía

- Nutraceuticals. Disponible en: <http://newhope360.com/market-making>. (Acceso 31 Agosto 2015).
- Berasategi I., Cuervo M., Ruiz de las Heras A., Santiago S., Martínez J.A., Astiasarán I. y Ansorena D. (2011). The inclusion of functional foods enriched in fibre, calcium, iodine, fat-soluble vitamins and n-3 fatty acids in a conventional diet improves the nutrient profile according to the Spanish reference intake. *Public Health and Nutrition*, 14: 451-458.
- Bermúdez de Castro J.M^a. (2002). *El chico de la Gran Dolina*. Crítica. Colección Drakonto. Madrid, España. Pp.: 178-193.
- Berridge M. (1998). Neuronal Calcium Signaling. *Neuron*, 21: 13-26.
- Biesalski H. (2005). Meat as a comonent of a healthy diet- are there any risks or benefits if meat is avoided in the diet? *Meat Science*, 70: 509-524.
- Bjelakovic G., Nikolova D., Gluud L.L., Simonetti R.G. y Gluud C. (2008). Antioxidant supplements for prevention of mortality in healthy participants and patients with various diseases. *Cochrane Database of Systematic Reviews*, 2. Art. No.: CD007176.
- Bloukas J.G., Arvanitoyannis I.S. y Siopi A.A. (1999). Effect of natural colourants and nitrites on colour attributes of frankfurters. *Meat Science*, 52: 257-265.
- Borderías A.J., Sánchez-Alonso I. y Pérez-Mateos M. (2005). New applications of fibres in food: addition to fishery products. *Trends in Food Science and Technology*, 16(10): 458-465.
- Bosscher D., Van Cauwenbergh L.Z., Van Cauwenbergh R., Van Caillie-Bertrand M., Robberfecht H. y Deelstra H. (2001). A method for in vitro determination of calcium, iron and zinc availability from first-age infant formula and human milk. *International Journal of Food Sciences and Nutrition*, 52: 173- 182.
- Bosscher D., Van Caillie-Bertrand M., Van Cauwenbergh R. y Deelstra H. (2002). Availabilities of calcium, iron, and zinc from dairy infant formulas is affected by soluble dietary fibers and modified starch fractions. *Nutrition*, 19: 641-645.
- Bouillon R., Van Cromphaut S. y Carmeliet G. (2003). Intestinal calcium absorption: molecular vitamin D mediated mechanism. *Journal of Cellular Biochemistry*, 88(2): 332-339.
- Bourne M.C. (1978). Texture profile analysis. *Food Technology*, 32 (7): 62-66.

Bibliografía

- Brandt L.A. (2002). Calcium the essential mineral. Formulation and Ingredient Challenges, November. Disponible en: <http://www.preparedfoods.com/archives/2002/>. (Acceso 27 Octubre 2015).
- Burdock G.A., Carabin I.G. y Griffiths J.C. (2006). The importance of GRAS to the functional food and nutraceutical industries. *Toxicology*, 221: 17-27.
- Buttriss J.L. y Benelam B. (2010). Nutrition and ealth claims: the role of food composition data. *European Journal of Clinical Nutrition*, 64: S8-S13.
- Cáceres E., García M.L., Toro J. y Selgas M.D. (2004). The effect of fructooligosaccharides on the sensory characteristics of cooked sausages. *Meat Science*, 68: 87-96.
- Cáceres E. (2006). Diseño de productos cárnicos más saludables mediante la incorporación de ingredients funcionales. Tesis Doctoral. Facultad de Veterinaria. Universidad Complutense de Madrid.
- Cáceres E., García M.L. y Selgas M.D. (2006). Design of a new cooked meat sausage enriched with calcium. *Meat Science*, 73: 368-377.
- CacoReady (2010). Kit CacoReady™ for Caco-2 cells. User's manual. Barcelona, España. Advancell®.
- Calvo M.M., García M.L. y Selgas M.D. (2008). Dry fermented sausages enriched with lycopene from dry tomato peel. *Meat Science*, 80: 167-172.
- Cámara-Martos F. y Amaro-López M. A. (2002). Influence of dietary factors on calcium bioavailability. *Biological Trace Element Research*, 89: 43-52.
- Cámara F., Amaro M.A., Barberá R. y Clemente G. (2005). Bioaccessibility of minerals in school meals: Comparison between dialysis and solubility methods. *Food Chemistry*, 92: 481-489.
- Cámara F., Barberá R., Amaro M.A. y Farré R. (2007). Calcium, iron, zinc and copper transport and uptake by Caco-2 cells in school meals: Influence of protein and mineral interaction. *Food Chemistry*, 100: 1085-1092.
- Carbajal A. (2005). Evolución del consumo de carne y derivados. Factores que condicionan su ingesta y papel nutricional en la dieta española. En: *Derivados Cárnicos Funcionales: Estrategias y Perspectivas* (Ed.: F. Sánchez-Muniz, F. Jiménez-Colmenero y B. Olmedilla-Alonso). Fundación Española de la Nutrición. Madrid. España. Pp.: 21-33.
- Cashman K.D. (2002). Calcium intake, calcium bioavailability and bone health. *British Journal of Nutrition, Suppl.* 2: S169-S177.

Bibliografía

- Cashman K.D. (2003). Prebiotics and calcium bioavailability. *Current Issues Intestinal Microbiology*, 4: 21-32.
- Cerklewski F.L. (2005). Calcium fortification of food can add unneeded dietary phosphorus. *Journal of Food Composition and Analysis*, 18: 595-598.
- Charalampopoulos D. y Rastall R. (2012). Prebiotics in food. *Current opinion in Biotechnology*, 23: 187-191.
- Charonenkiatkul S., Kriengsinyos W., Tuntipopipat S., Suthutvoravut U. y Weaver C.M. (2008). Calcium absorption from commonly consumed vegetables in healthy Thai women. *Journal of Food Science*, 73 (9): H218-H221.
- Chapuy M.C., Arlot M.E., Duboeuf F., Brun J., Crouzet B., Arnaud S., Delmas P.D. y Meunier P.J. (1992). Vitamin D3 and calcium to prevent hip fractures in the elderly women. *The New England Journal of Medicine*, 327: 1637-1642.
- Cheng Q. y Da-Wen S. (2008). Factors affecting the water holding capacity of red meat products: a review of recent research advances. *Critical Review of Food Science and Nutrition*, 48(2): 137-159.
- Cherayil B.J. (2011). The role of iron in the immune response to bacterial infection. *Immunologic Research*, 50(1): 1-9.
- Cilla A., Lagarda J., Alegría A., Ancos B., Cano M.P., Sánchez-Moreno C., Plaza L. y Barberá R. (2011). Effect of processing and food matrix on calcium and phosphorous bioavailability from milk-based fruit beverages in Caco-2 cells. *Food Research International*, 44 (9): 3030-3038.
- Cilla A., Lagarda M.J., Alegría A., de Ancos B., Cano M.P., Sánchez-Moreno C., Plaza L. y Barberá R. (2012). Effect of processing and food matrix on calcium and phosphorous bioavailability from milk-based fruit beverages in Caco-2 cells. *Food Research International*, 44: 3030-3038.
- Códex Alimentario (1997) Principios generales para la adición de nutrientes esenciales a los alimentos. CAC/GL 09-1987. Pp.: 1-4.
- Códex Alimentario (1999) Programa conjunto FAO/OMS sobre normas alimentarias comisión del Codex Alimentarius. <http://www.fao.org/docrep/w9114e/w9114e00.htm>. (Acceso 26 Octubre 2015).
- Cofrades S., Serrano A., Ayo J., Solas M.T., Carballo J., Jiménez Colmenero F. (2004). Restructured beef with different proportions of walnut as affected by meat particle size. *European Food Research and Technology*, 218: 230-236.

Bibliografía

- Cofrades S., Ayo J., Serrano A., Carballo J. y Jiménez-Colmenero F. (2006). Walnut, microbial transglutaminase and chilling storage time effects on salt-free beef batter characteristics. *European Food Research and Technology*, 222: 548-466.
- Costa F.F., Resende J.V., Abreu L.R. y Goff H.D. (2008). Effect of calcium chloride addition on icecream structure and quality. *Journal of Dairy Science*, 91(6): 2165-2174.
- Costa-Corredor A., Serra X., Arnau J. y Gou P. (2009). Reduction of NaCl content in restructured dry-cured hams: Post-resting temperature and drying level effects on physicochemical and sensory parameters. *Meat Science*, 83: 390-397.
- Cotter A.A. y Cashman K.D. (2005). The effect of two dietary and a synthetic phytoestrogen on transepithelial calcium transport in human intestinal- like Caco-2 cells. *European Journal of Nutrition*, 44: 72-78.
- Cowley D., Nelson C. y Weatherford W. (1987). Calcium fortified-milk. United States Patent. US 4701329 A.
- Cui S.W. y Roberts K.T. (2009). Dietary Fiber: Fulfilling the promise of added value formulations. En: *Modern Biopolymer Science. Bridging the divide between fundamental treatise and industrial application*. (Ed.: S. Kasapis, I.T. Norton y J.B. Ubbink). Elsevier. San Diego, USA. Pp.: 399-448.
- Cummings A.R., Black D.M., Nevitt M.C., Browner W., Cauley J., Ensrud K., Genant H.K., Palermo L., Scott J. y Vogt T.M. (1993). Bone density at various sites for prediction of hip fractures. The Study of Osteoporotic Fractures Research Group. *Lancet*, 341: 72-75.
- Currey J. (2000). The structure of bone tissue. En: *Bones, structure and mechanics*. (Ed.: J.D. Currey). Princeton University Press. Oxfordshire, Inglaterra. Pp.: 3-27.
- Daengprok W., Garnjanagoonchorn W. y Mine Y. (2002). Fermented pork sausage fortified with commercial or hen eggshell calcium lactate. *Meat Science*, 62: 199-204.
- Damodaran S. (2008). Amino acids, peptides and proteins. En: *Fennema food Chemistry* 4th ed. (Ed.: S. Damodaran, K.L. Parkin y O.R. Fenemma). CRC Press Boca Ratón. FL. USA. Pp.: 217-329.
- Dawson-Hughes B., Harris S.S., Krall E.A. y Dallal G.E. (1997). Effect of calcium and vitamin D supplementation on bone density in men and women 65 years of age or older. *The New England Journal of Medicine*, 337: 670-676.

Bibliografía

- Decker E.A. y Park Y. (2010). Healthier meat products as functional foods. *Meat Science*, 86(1): 49-55.
- De Natale C., Minerva V., Patti L., Mazzarella R., Ciano O., Maione S., Luongo D., Naviglio D., Marotta G., Turco S., Ciati R., Melegari C., Rivellesse A.A. y Riccardi G. (2012). Effects of baked products enriched with n-3 fatty acids, folates, β -glucans, and tocopherol in patients with mild mixed hyperlipidemia. *Journal of American College of Nutrition*, 31(5): 311-319.
- De Souza-Nogueira C., Colli C. y Silverio-Amancio OM. (2004). Infant formula iron dialysability related to other nutrients. *Food Chemistry*, 90(4): 779-783.
- Delgado G. (2013) Diseño y desarrollo de productos cárnicos con perfil lipídico optimizado. Evaluación del efecto funcional en humanos. Tesis doctoral. Facultad de Veterinaria. Universidad Complutense de Madrid.
- Delie F. y Rubas W. (1997). An human colonic cell line sharing similarities with enterocytes as a model to examine oral absorption: advantages and limitations of the Caco-2 model. *Critical Reviews in Therapeutic Drug Carrier Systems*, 14(3): 221-286.
- Dendougui F. y Schwedt G. (2004). *In vitro* analysis of binding capacities of calcium to phytic acid in different food samples. *European Food Research*, 219: 409-415.
- Desmond E. (2006). Reducing salt: a challenge for the meat industry. *Meat Science*, 74: 188-196.
- Desmond E. (2007). Reducing salt in meat and poultry products. En: *Reducing salt foods*. (Ed.: Kilcast D. y Angus F.). Woodhead Publishing. Cambridge, Inglaterra. Pp.: 233-255.
- Devaraj S., Ishwarlal J. y Vega-López S. (2004). Plant sterol-fortified orange juice effectively lowers cholesterol levels in mildly hypercholesterolemic healthy individuals. *Arteriosclerosis, Thrombosis, and Vascular Biology*, 24(3): e25-e28.
- Devatkal S. y Mendiratta S.K. (2001). Use of calcium lactate with salt-phosphate and alginate-calcium gels in restructured pork rolls. *Meat Science*, 58: 371-379.
- Devlin T.M. (2004). Estructura celular eucariota. En: *Bioquímica 4ª edición* (Ed.: Devlin T.M.). Reverté. Barcelona, España. Pp.: 3-26.
- Diplock A.T., Ashwell P.J., Bornet M.F., Fern E. y Roberfroid M.B. (1999). Scientific Concepts of functional foods in Europe: Consensus document. *British Journal of Nutrition*. 81: S1 (DOI: 10.1079/BJN19990002).

Bibliografía

- Doblaré M., García J.M. y Gómez M.J. (2004). Modelling bone tissue fracture and healing: review. *Engineering Fracture Mechanics*, 71(13-14): 1809-1840.
- Domke A., Großklaus R., Niemann B., Przyrembel H., Richter K., Schmidt E., Weißenborn A., Wörner B. y Ziegenhagen R. (2006). Risk Assessment of Calcium. En: Use of minerals in food. Toxicological and nutritional-physiological aspects. Contents and binding BfR-Hausdruckerei Dahlem. Berlín, Alemania. Pp.: 89-109.
- Doyle M.E. y Glass K.A. (2010). Sodium reduction and its effect on food safety, food quality, and human health. *Comprehensive Reviews in Food Science and Food Safety*, 9: 44-56.
- Duchateau G.S.M.J.E. y Klaffke W. (2009). Health food product composition, structure and bioavailability. *Designing functional foods*. (Ed.: J. McClements y E.A. Decker). Woodhead Publishing Limited. Oxford, Inglaterra. Pp.: 647-675.
- Dyckner T. (1980). Serum magnesium in acute myocardial infarction. *Acta Medical Scandinavia*, 207: 59-66.
- Eaton S.B. y Konner M. (1985). Paleolithic nutrition. A consideration of its nature and current implications. *New England Journal of Medicine*, 312: 283-289.
- Eichner E.R. (1992). Sports anemia, iron supplements, and blood doping. *Medicine and Science in Sports and Exercise*, 24(9): S315-S318.
- Ekmekcioglu C. (2002). A physiological approach for preparing and conducting intestinal bioavailability studies using experimental systems. *Food Chemistry*, 76: 225-230.
- Etcheverry P., Grusak M.A. y Fleige L.E. (2012). Application of *in vitro* bioaccessibility and bioavailability methods for calcium, carotenoids, folate, iron, magnesium, polyphenols, zinc, and vitamins B₆, B₁₂, D, and E. *Frontiers in physiology*, 3: 1-22.
- European Commission Community Research (2000). Project Report: Functional food science in Europe, Volume 1; Functional food science in Europe, Volume 2; Scientific concepts of functional foods in Europe, Volume 3. EUR-18591, Office for Official Publications of the European Communities, L-2985, Luxembourg.
- Fairè, R. y Frasquet I. (1999). Calcio, fósforo y magnesio. En: Tratado de nutrición. (Ed.: M. Hernández y A. Sastre) Días de Santos. Madrid, España. Pp.: 217-229.
- Fairweather-Tait S.J. (1993). Bioavailability of nutrientes. En: Encyclopedia of food science, food technology and nutrition. (Ed.: R. Macrae, R.K. Robinson y M.J. Sadler). Academic Press. Londres, Inglaterra. Pp.: 384-388.

Bibliografía

- FAO/OMS (2002). Joint FAO/WHO Working Group Report on Guidelines for the Evaluation of Probiotics in Food. Disponible en: <ftp://ftp.fao.org/es/esn/food/wgreport2.pdf>. (Acceso 27 Octubre 2015).
- FAO (2007). Report on Functional Foods. Disponible en: http://webcache.googleusercontent.com/search?q=cache:ew68C_bE4gMJ:www.hranomdozdravlja.com/slatkis/file.php%3Ffile%3DFunctional_Foods_Report_Nov2007.pdf+&cd=1&hl=en&ct=clnk&gl=es. (Acceso 27 Octubre 2015).
- FDA (2014). Disponible en: <http://www.fda.gov/Food/FoodScienceResearch/SafePracticesforFoodProcesses/ucm094192.htm>. Última actualización 26/11/2014. (Acceso Octubre 2015).
- Feldman D., Glorieux F.H. y Pike J.W. (2011). Vitamin D. Academic Press. San Diego, CA, USA. Pp.: 1-1285.
- Fernández-García E.L., Carvajal-Lérida I. y Pérez-Gálvez A. (2009). In vitro bioaccessibility assessment as a prediction tool of nutritional efficiency. *Nutrition Research*, 29: 751-760.
- Fernández-Ginés J.M., Fernández-López J., Sayas-Barbera E., Sendra E. y Pérez-Álvarez J.A. (2003). Effect of storage conditions on quality characteristics of bologna sausages made with citrus fibre. *Journal of Food Science*, 68: 710-715.
- Fernández Ginés J.M., Fernández López J., Sayas Barberá E. y Pérez Álvarez J.A. (2005). Meat products as functional foods: a review. *Journal of Food Science*, 70(2): R37-43.
- Fernández J., Viuda M., Sendra E., Sayas E., Navarro C. y Pérez J.A. (2007). Orange fibre as potential functional ingredient for dry-cured sausages. *European Food Research and Technology*, 226: 1-6.
- Fernández J., Vidua-Martos M., Sendra E., Sayas-Barbera E., Navarro C. y Pérez-Álvarez J.A. (2011). Orange fibre as potential functional ingredient for dry-cured sausages. *International Journal of Livestock Production*, 2(4): 45-54.
- Ferrar L., Van der Hee R., Wilkinson J., Watson C., Berry M. y Eastell R. (2010). The effect of daily calcium-fortified ice cream on bone turnover and parathyroid hormone in young women taking a diet low in calcium. *Bone*, 47(1): S173.
- Fik M., Surówka K., Maciejaszek I., Macura M. y Michalczyk M. (2012). Quality and shelf life of calcium-enriched whole meal bread stored in a modified atmosphere. *Journal of Cereals Science*, 56(2): 418-424.

Bibliografía

- Fleet J.C., Bradley J., Reddy GS., Ray R. y Wood R J .(1996). 1-alpha,25-(OH)₂-vitamin D₃ analogs with minimal in vivo calcemic activity can stimulate significant transepithelial calcium transport and mRNA expression in vitro. *Archives Biochemistry and Biophysics*, 329(2): 228-34.
- Flores M., Nieto P., Ferrer J.M. y Flores J. (2005). Effect of calcium chrolide on the volatile pattern and sensory acceptance of dry-fermented sausages. *European Food Research and Technology*, 221(5): 624-630.
- Fogh J., Fogh J.M. y Orfeo R. (1977). One hundred and twenty-seven cultured human tumor cell lines producing tumors in nude mice. *Journal of National Cancer Institute Advances*, 59: 221-226.
- Fontecha J. (2003). Los probióticos en los alimentos: origen y efectos sobre el organismo humano. En: *Nuevos alimentos para nuevas necesidades*. Servicio de Promoción de la Salud, Instituto de Salud Pública, Consejería de Sanidad, Comunidad de Madrid, España. Pp.: 71-80.
- Fossati L., Dechaume R., Hardillier E., Chevillon D., Prevost C., Bolze S. y Maubon N. (2008). Use of simulated intestinal fluid for Caco-2 permeability assay of lipophilic drugs. *International Journal of Pharmaceutics*, 360(1-2): 148-155.
- Frontela C. (2007). Efecto de la adición de fitasa sobre la biodisponibilidad mineral in vitro en papillas infantiles. Tesis doctoral. Facultad de Veterinaria. Universidad de Murcia.
- Frontela C., Scarino M.L. , Ferruzza S., Ros G. y Martínez C. (2009). Effect of dephytinization on bioavailability of iron, calcium and zinc from infant cereals assessed in the Caco-2 cell model in infant formula. *World Journal of Gastroenterology*, 15(16): 1977-1984.
- Fuentes-Zaragoza E., Riquelme-Navarrete M.J., Sánchez-Zapata y Pérez-Álvarez J.A. (2010). Resistant starch as functional ingredient: a review. *Food Research International*, 43: 931-942.
- Gangloff MB., Glahn RP., Miller DD. y Van Campen DR. (1996). Assessment of iron availability using combined in vitro digestion and caco-2 cells culture. *Nutrition Research*, 16: 479-487.
- Galán I., García M.L. y Selgas M.D. (2010). Effects of ionizing irradiation on quality and sensory attributes of ready-to-eat dry fermented sausages enriched with folic acid. *International Journal of Food Science and Technology*, 46(3): 469-477.

Bibliografía

- Galán I., Garcia M.L. y Selgas M.D. (2011^a). Irradiation is useful for manufacturing ready-to-eat cooked meat products enriched with folic acid. *Meat Science*, 87: 330-335.
- Galán I., Garcia M.L. y Selgas M.D. (2011^b). Effects of ionising irradiation on quality and sensory attributes of ready-to-eat dry fermented sausages enriched with folic acid. *International Journal of Food Science & Technology*, 46: 469-477.
- Gandomska-Nowak, Szulc-Musiol B. y Ryszka F. (2008). Pharmacokinetics of calcium from calcium supplements in healthy volunteers. *Pakistan Journal of Pharmaceutical Sciences*, 21(2): 109-112.
- García M. L., Domínguez R., Gálvez M., Gálvez D., Casas C. y Selgas M. D. (2002). Utilisation of cereal and fruit fibres in low fat dry fermented sausage. *Meat Science*, 60: 227-236.
- García M., Berasategi I., Navarro I., Astiasarán I. y Ansorena D. (2012). Reduction of sodium and increment of calcium and ω -3 polyunsaturated fatty acids in dry fermented sausages: effects on the mineral content, lipid profile and sensory quality. *Journal of the Science of Food and Agriculture*, 93: 876-881.
- García-Iñáñez de Ciriano M., Larequi E., Rehecho S., Calvo M.I., Cavero R.Y., Navarro-Blasco I., Astiasarán I. y Ansorena D. (2010). Selenium, iodine, omega3-PUFA and natural antioxidant from *Melissa officinalis* L.: a combination of components from healthier dry fermented sausages formulation. *Meat Science*, 85(2): 274-279.
- Garti N. y Aserin A. (2012). Micelles and microemulsions as food ingredient and nutraceutical delivery systems. En: *Encapsulation technologies and delivery systems for food ingredients and nutraceuticals*. (Ed.: N. Garti y J. McClements). Woodhead Publishing. Cambridge, Inglaterra. Pp: 211-251.
- Gelroth J. y Ranhotra G.S. (2001). Food uses of fiber. En: *Handbook of Dietary Fiber*. (Ed.: S. Cho y M. Dreher). Marcel Dekker. New York, USA. Pp.: 435-451.
- Gibson RS. (2007). The role of diet- and host-related factors in nutrient bioavailability and thus in nutrient-based dietary requirement estimates. *Food and Nutrition Bulletin*, 28(1): S77-100.
- Gilman J. y Cashman K. (2006). The effect of probiotic bacteria on transepithelial calcium transport and calcium uptake in human intestinal like caco 2 cells. *Current Issues Intestinal Microbiology*, 7: 1-6.

Bibliografía

- Gimeno O, Astiasarán I. y Bello J. (1998). A mixture of potassium, magnesium and calcium chlorides as a partial replacement of sodium chloride in dry fermented sausages. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, 46(10): 4372-4375.
- Gimeno O, Astiasarán I. y Bello J. (1999). Influence of partial replacement of NaCl with KCl and CaCl₂ on oil texture and color of dry fermented sausages. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*. 47(3): 873-877.
- Gimeno O., Astiasarán I. y Bello J. (2001). Calcium ascorbate as a potential partial substitute for NaCl in dry fermented sausages: effect on color, texture and hygienic quality at different concentrations. *Meat Science*, 57(1): 23-29.
- Glahn R.P. (1998). Caco-2 cell ferritin formation predicts nonradiolabeled food iron availability in an in vitro digestion/Caco-2 cell culture model. *Journal of Nutrition*, 128: 1555 -1561.
- Gonelli S., Campagna M.S, Montagani A., Caffarelli C., Cadrini A., Giorgi G. y Nuti R. (2007). Calcium bioaccessibility from a new calcium-fortified orange beverage, compared with milk, in healthy volunteers. *International Journal of Vitamin and Nutrition Research*, 77(4): 249-254.
- González de Pablo A. (1999). Alimento, cultura, materia y ciencia. En: *Tratado de Nutrición*. (Ed.: M. Hernández, A. Sastre). Díaz de Santos. Madrid, España. Pp.: 4-12.
- González J.M. (2000). Osteoporosis. En: *Principios de Medicina Interna*. 14^o Edición. (Ed.: Rozman C. y Farreras P.V.). Harcourt. Madrid, España. Pp.: 1233-1242.
- González R., Ferreira A.M., Noris-Suarez K. y Feijoo J.L. (2008). Caracterización de la interacción colágeno-hidroxiapatita. *Revista Iberoamericana de Polímeros*, 9(3): 300-302.
- Greenwood, N. N. y Earnshaw, A. (1997). *Chemistry of the Elements* (2^o Edición), Elsevier Butterworth-Heinemann. Oxford, Inglaterra. Pp.: 1-1283.
- Griguelmo N., Abadías M.I. y Martín O. (1999). Characterisation of low-fat high-dietary fibre frankfurters. *Meat Science*, 52: 247-256.
- Guéguen L. y Pointillart A. (2000). The bioavailability of dietary calcium. *Journal of the American College of Nutrition*, 19(2): 119S-136S.
- Guo M. (2009). Liquid milk products. *Liquid milk products: modified milks*. *Encyclopedia of Dairy Sciences* (Second Edition). (Ed.: J.W. Fuquay, P. F. Fox y P.L.H. McSeeney). Academic Press. Oxford, Inglaterra. Pp.: 297-300.

Bibliografía

- Gurbuz U., Ardic M. y Calim H.D. (2009). Microbiological characteristics of Turkish Semi-Dry Fermented sausages during processing stages and storage. *Journal of Animal and Veterinary Advances*, 8(4): 677-682.
- Haderslev K.V., Jeppesen P.B., Mortensen P.B. y Staun M. (2000). Absorption of calcium and magnesium in patients with intestinal resections treated with medium chain fatty acids. *An International Journal of Gastroenterology and Hepatology (Gut)*, 46: 819-823.
- Han O., Failla M.L., Hill A.D., Morris E.R. y Smith J.C.Jr. (1994). Inositol phosphates inhibit uptake and transport of iron and zinc by a human intestinal cell line. *Journal of Nutrition*, 124: 580-587.
- Hänsch R. y Mendel R. (2009). Physiological functions of mineral micronutrients (Cu, Zn, Mn, Fe, Ni, Mo, B, Cl). *Current opinion in plant biology*, 12: 259-266.
- Hanson S.W.F. y Olley J. (1963). Application of the Bligh and Dyer method of lipid extraction to tissue homogenates. *Biochemical Journal*, 89: 101-102.
- Hardy, G. (2000). Nutraceuticals and functional foods: Introduction and meaning. *Nutrition*, 16: 688-697.
- Harris D. (2000). Cellular copper transport and metabolism. *Annual Review of Nutrition*, 20: 291-310.
- Hart D.J., Fairweather-Tait S.J., Broadley M.R., Dickinson S.J., Foot I., Knott P., McGrath S.P., Mowat H., Norman K., Scott P.R., Stroud J.L., Tucker M., White P.J., Zhao F.J. y Hurs R. (2009). Selenium concentration and speciation in biofortified flour and bread: Retention of selenium during grain biofortification, processing and production of Se-enriched food. *Food Chemistry*, 126(4): 1771-1778.
- Hartmann, R. y Meisel, H. (2002). Cytochemical assessment of phospho- peptides derived from casein as potential ingredients for functional food. *Nahrung*, 46, 427-431.
- Hazell B.Y. y Johndon I.T. (1987). *In vitro* estimation of iron availability from a range of plant foods: influence of phytate, ascorbate and citrate. *British Journal of Nutrition*, 57: 223-233.
- Heany R., Weaver C. y Recker R. (1988). Calcium absorbability from spinach. *The American Journal of Clinical Nutrition*, 47: 707-709.
- Heany, R.P. (2000). Calcium, dairy products, and osteoporosis. *Journal of the American College of Nutrition*, 19: 83S-99S.

Bibliografía

- Heany RP. (2001). Factors influencing the measurement of bioavailability, taking calcium as a model. *Journal of Nutrition*, 131:1344S-1348S.
- Heany R. y Weaver C.M. (2005). Newer perspectives on calcium nutrition and bone quality. *Journal of the American College of Nutrition*, 24(6): 574S-581S.
- Heany R. (2009). Dairy and bone health. *Journal of the American College of Nutrition*, 28(1): 82s-90S.
- Herrero A.M., Ordóñez J.A., Romero de Ávila M.D., Herranz B., de la Hoz L. y Cambero M.I. (2007). Breaking strength of dry fermented sausages and their correlation with texture profile analysis (TPA) and physico-chemical characteristics. *Meat Science*, 77: 331-338.
- Herold G., Besemer F. y Rogler D. (1994). Morphology of Caco-2 cells varies in different batches. *In vitro cellular and Developmental Biology*, 30A(5): 289-291.
- Hidalgo I.J., Raub T.J. y Borchardt R.T. (1989). Characterization of the human colon carcinoma cell line (Caco-2) as a Model System for intestinal epithelial permeability. *Gastroenterology*, 96: 736-749.
- Holst B y Williamson G. (2008). Nutrients and phytochemicals: from bioavailability to bioefficacy beyond antioxidants. *Current Opinion in Biotechnology*, 19:73-82.
- Homayouni A., Ehsani M.R., Azizi A., Yarmand M.S. y Razavi S.H. (2007). Selection of an appropriate probiotic strains for use in ice cream. *Proceeding of the third IDF international symposium on ice cream*. 4-6 Diciembre 2007. Cologne, Alemania. Pp.: 124.
- Horita C.N., Morgano M.A., Celeghini R.M.S. y Pollonio M.A.R. (2011). Physico-chemical and sensory properties of reduced-fat mortadella prepared with blends of calcium, magnesium and potassium chloride as partial substitutes for sodium chloride. *Meat Science*, 89: 426-433.
- Hurrell R y Egli I. (2010). Iron bioavailability and dietary reference values. *American Journal of Clinical Nutrition*, 91(5): 1461S-1467S.
- Ibáñez F.C y Barcina Y. (2001). Ensayos Hedónicos. En: *Análisis sensorial de alimentos. Métodos y aplicaciones*. (Ed.: F.C. Ibáñez y Y. Barcina). Springer, S.A., Barcelona, España. Pp.: 90-110.
- Ikem A., Nwankwoala A., Odueyungbo S., Nyavor K. y Egiebor N. (2002). Levels of 26 elements in infant formula from USA, UK and Nigeria by microwave digestion and ICP-OES. *Food Chemistry*, 77 (4): 429-447.

Bibliografía

- ILSI Europe (2010). Process for the Assessment of Scientific Support for Claims on Foods, PASSCLAIM QLK1-2000-86. (2001-2005).
- Ingestas Dietéticas de Referencia (DRI) Definiciones (2007). Grupo de Revisión y Posicionamiento de la Asociación Española de Dietistas-Nutricionistas (GREP/AEDN). Última actualización 15 Junio 2012. Disponible en: http://www.adncyl.es/imagenes/asociados/230ar_DietaEnteralPlanas.pdf. (Acceso 27 Octubre 2015).
- Institute of Medicine (IOM, 2010). Dietary Reference Intakes: Recommended Intakes for Individuals. Departamento de Agricultura de los Estados Unidos. Disponible en: <http://www.iom.edu/Object.File/Marter/21/372/0>. (Acceso 15 Octubre 2015).
- Irvine J.D., Takahashi L., Lockhart K., Cheong J., Tolan J.W., Selick H.E. y Grove J.R. (1999). MDCK (Madin-Darby Canine Kidney) Cells: A Tool for Membrane Permeability Screening. *Journal of Pharmaceutical Sciences*, 88(1): 28-33.
- ISO (1998). Microbiology of food and animal feeding stuffs. Horizontal method for the enumeration of mesophilic lactic acid bacteria. Colony count technique at 20 degrees C. (ISO-DP 15214). International Organization for Standardization.
- ISO (2005). Sensory analysis. Methodology. General guidance (ISO-DP 6658). International Organization for Standardization.
- Jabr R. y Fry C. (2013). Animals models of lower urinary tract dysfunction. *Animals models for the study of human disease*. (Ed.: P.M. Conn). Elsevier. Londres, Inglaterra. Pp.: 461-481.
- Jayamanne V.S. y Adams M.R. (2006). Determination of survival, identity and stress resistance of probiotic bifidobacteria in bio-yoghurts. *Letters in Applied Microbiology*, 42: 189-194.
- Jewell C., Cusack S. y Cashman KD. (2005). The effect of conjugated linoleic acid on transepithelial calcium transport and mediators of paracellular permeability in human intestinal like Caco-2 cells. *Prostaglandins Leukotrienes Essential Fatty Acids*, 72(3): 163-171.
- Jiménez-Colmenero F., Carballo J. y Cofrades S. (2001). Healthier meat and meat products: their role as functional foods. *Meat Science*, 59: 5-13.
- Jiménez-Colmenero F., Serrano A., Ayo J., Solas M.T., Cofrades S. y Carballo J. (2003). Physicochemical and sensory characteristics of restructured beef steak with added walnuts. *Meat Science*, 65: 1391-1397.

Bibliografía

- Jorde R., Sundsjord J. y Bønaa K.H. (2001). Determinants of serum calcium in men and women. The Tromsø Study. *European Journal of Epidemiology*, 17(12): 1117-1123.
- Joshi P. y Brimelow C.J.B. (2002). Colour measurement of food by colour reflectance. En: *Colour in food*. (Ed.: D.B. MacDougall). CRC Press, Woodhead Publishing Ltd. Cambridge, Inglaterra. Pp.: 80-110
- Jovaní M., Barberá R. y Farré R. (2001). Review: Effect of some components of milk- and soy-based infant formulas on mineral bioavailability. *Food Science and Technology International*, 7: 191-198.
- Kathleen L., Mahan M.S. y Escott-Stump S. (1998). *Nutrición y dietoterapia de Krause*. Mc Graw-Hill Interamerica, Madrid. España. Pp.: 1- 1264.
- Keast R. S. J. y Breslin P. A. S. (2002). Cross-adaptation and bitterness inhibition of L-tryptophan, L-phenylalanine and urea: further support for shared peripheral physiology. *Chemical Senses*, 27: 123-131.
- Kelly R. (1995). Synaptotagmin is just a calcium sensor. *Current Biology*, 5 (3): 257-259.
- Keller C. (2006). Trends in beverages and “Measurable Health”. Proceedings of the third functional food net meeting. 16-18 Septiembre 2006. Liverpool, Inglaterra.
- Kelly O., Cusack S., Jewell C. y Cashman K.D. (2003). The effect of polyunsaturated fatty acids, including conjugated linoleic acid, on calcium absorption and bone metabolism and composition in young growing rats. *British Journal of Nutrition*, 90: 743-750.
- Kendall C.W., Esfahania A. y Jenkinsa D. (2010). The link between dietary fibre and human health. *Food Hydrocolloids*, 24: 42-48.
- Kessler G. y Wolfman M. (1964). An automated procedure for the simultaneous determination of calcium and phosphorus. *Clinical Chemistry*, 10(8): 686-703.
- Khosla S. y Melton J. (2007). Osteoporosis. *The New England Journal of Medicine*, 356: 2293-2300.
- Kim Y.H., Hunt M. C., Mancini R. A., Seyfert M., Loughin T. M., Kropf D.H. y Smith S. (2006). Mechanism for lactate-color stabilization in injection-enhanced beef. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, 54: 7856-7862.
- Kirkhus B., Lamglait A., Eilertsen K-E., Falch E., Haider T., Vik H., Hoem N., Hagve T-A., Basu S., Olsen E., Seljeflot I., Nyberg L., Elind E. y Ulven S. (2012). Effects of similar intakes of marine n-3 fatty acids from enriched food products and fish oil on cardiovascular risk markers in healthy human subjects. *British Journal of Nutrition*, 107: 1339-1349.

Bibliografía

- Kloss L., Dawn Meyer J., Graeve L. y Vetter W. (2015). Sodium intake and its reduction by food reformulation in the European Union- a review. *NFS Journal*, 1: 9-19.
- Koletzko B., Baker S., Cleghorn G., Fagundes Neto U., Gopalan S., Hernell O., Seng Hock Q., Jirapinyo P., Lonnerdal B., Pencharz P., Pzyrembel H., Ramirez-Mayans J., Shamir R., Turck D., Yamashiro Y. y Zong-Yi D. (2005). Global standard for the composition of infant formula: recommendations of an ESPGHAN coordinated international expert group. *Journal of Pediatric Gastroenterology and Nutrition*, 41: 584-599.
- Korpela R., Jaakko T., Högström P., Seppo L., Piironen V., Salo-Väänänen P., Toivo J., Lamberg-Allardt C., Kärkkäinen M., Outila T., Sundvall J., Vilkkilä S. y Tikkanen M. J. (2006). Safety aspects and cholesterol-lowering efficacy of low fat dairy products containing plant sterols. *European journal of clinical nutrition*, 60(5): 633-642.
- Korstanje R. y Hoek M. (2001). Calcium and others minerals. En: *Guide to functional food ingredients*. (Ed.: J. Young). LFRA Ltd. Wiltshire, Inglaterra. Pp.: 197-210.
- Krishnakumar V. y Gordon I.R. (2001). Probiotics: Challenges and opportunities. *Dairy Industries International*, 66 (2): 38-40.
- Kruger M.C., Gallaher B.W. y Schollum L.M. (2003). Bioavailability of calcium is equivalent from milk fortified with either calcium carbonate or milk calcium in growing male rats. *Nutrition Research*, 23: 1229-1237.
- Kwak N. S. y Jukes D. J. (2001). Functional foods. Part 1. The development of a regulatory concept. *Food Control*, 12: 99-107.
- Langa S. (2006). Interacciones entre bacterias lácticas, células del epitelio intestinal y células del sistema inmunitario. Desarrollo de modelos *in vitro*. Tesis doctoral. Facultad de Veterinaria. Universidad Complutense de Madrid.
- Latham M.C. (2002). Colección FAO: Alimentación y nutrición N° 29. Organización de las Naciones Unidas para la Agricultura y la Alimentación. Roma. Disponible en: http://www4.fao.org/cgi-bin/faobib.exe?vq_query=A%3DLatham,%20M.C.&database=faobib&search_type=view_query_search&format_name=@SLMON&sort_name=@SCHR&table=mona&page_header=sphmon&lang=sp. (Acceso 27 Octubre 2015).
- Laurikainen T., Harkonen H., Autio K. y Poutanen K. (1998). Effects of enzymes in fiber-enriched baking. *Journal of the Science of Food and Agriculture*, 76: 239-249.

Bibliografía

- Lawless H.T., Rapacki F., Horne J. y Hayes A. (2003). The taste of calcium and magnesium salts and anionic modifications. *Food Quality and Preference*, 14: 319-325.
- Lawrie R.A. (1998). The eating quality of meat. En: *Lawrie's meat Science*. (Ed.: R.A. Lawrie). Woodhead Publishing Ltd. Cambridge, Inglaterra. Pp.: 212-258.
- Le Ferrec y col. (2001) In vitro models of the intestinal barrier. *ECVAM Workshop Report 46. Atla*, 29: 649-668.
- Lind T., Lonnerdal B., Stenlund H., Ismail D., Seswandhana R., Ekström EC. y Persson L. (2003). A community-based randomized controlled trial of iron and zinc supplementation in Indonesian infants: interactions between iron and zinc. *American Journal of Clinical Nutrition*, 77: 883-90.
- Ling P.P, Ruzhitsky V.N., Kapanidid A.N. y Lee T.C. (1996) Measuring the colour of food. *Chemical Technology*, 11 (3): 46-52.
- López-Aliaga I., Díaz-Castro J., Nestares T., Muñoz M.J. y Sánchez M. (2009). Calcium-supplemented goat milk does not interfere with iron absorption in rats with anemia induced by dietary iron depletion. *Food Chemistry*, 113(3): 839-841.
- López-Huertas E., Teucher B, Boza J.J., Martínez-Férez A., Majsak-Newman G., Baró L., Carrero J.L., González-Santiago M., Fonollá J. y Fairweather-Tait S. (2006). Absorption of calcium from milks enriched with fructooligosaccharides, caseinophosphopeptides, tricalcium phosphate and milk solids. *American Journal of Clinical Nutrition*, 83: 310-316.
- Lukaski H. (1999). Chromium as a supplement. En: *Annual review of nutrition*, Vol 19. (Ed.: D.B. McCormick, D.M. Bier, A.G. Goodridge y R. Parmer). Palo Alto, CA, USA. Annual Reviews Inc. Pp.: 279.
- Lukaski H. (2004). Vitamin and Mineral Status: Effects on Physical Performance. *Nutrition*, 20: 632-644.
- Lummela N., Kekkonen R., Jauhiainen R., Pilvi T.K., Tuure T., Järvenpää S., Eriksson J. y Korpela R. (2009). Effects of a fibre-enriched milk drink on insulin and glucose levels in healthy subjects. *Nutrition Journal*, 8(1): 45.
- Lynch S. (2007). Influence of infection/inflammation, thalassemia and nutritional status on iron absorption. *International Journal of Vitamin and Nutrition Research*, 77(3):217-223.

Bibliografía

- Maïmoun L. y Sultan C. (2009). Effect of Physical Activity on Calcium Homeostasis and Calcitropic Hormones: A Review. *Calcified Tissue International*, 85: 277-286.
- Mancini R.A. y Hunt M.C. (2005). Current research in meat color. *Meat Science*, 71: 100-121
- Mancini R.A. y Ramanathan R. (2008). Sodium lactate influences myoglobin redox stability in vitro. *Meat Science*, 78: 529-532.
- Mann J. I. y Cummings J. H. (2009). Possible implications for health of the different definitions of dietary fibre. *Nutrition, Metabolism and Cardiovascular Diseases*, 19: 226-229.
- Mark-Herbert C. (2004). Innovation of a new product category—Functional foods. *Technovation*, 24: 713-719.
- Marmot M., Atinmo T., Byers T., Chen J., Hirohata T., Jackson A. y James W. (2007). Food, Nutrition, Physical Activity, and the Prevention of Cancer: a Global Perspective. (WCRF/AICR Expert Report). World Cancer Research Fund / American Institute for Cancer Research: Washington DC, US.
- Martínez O. y Suárez M.D. (2010). Metabolismo de los hidratos de carbono. En: *Tratado de Nutrición: bases fisiológicas y bioquímicas de la nutrición*, volumen 1. (Ed.: A. Gil). Paramericana. Madrid, España. Pp.: 202-232.
- Martín R., Heilig G.H.J., Zoetendal E.G., Smidt H. y Rodríguez J.M. (2007). Diversity of the *Lactobacillus* group in breast milk and vagina of healthy women and potential role in the colonization of the infant gut. *Journal of Applied Microbiology*, 103: 2638-2644.
- Martone M., Saul A., Edelman V., Airey J. y Ellisman M. (1997). Distribution of inositol-1,4,5-trisphosphate and ryanodine receptors in rat neostriatum. *Brain Research*, 756: 9-21.
- Mataix J. (2009). *Tratado de Alimentación y Nutrición*. Volumen I. Océano/Ergon. Pp: 1- 2032.
- McAfee A.J., McSorley E.M., Cuskelly G.J., Moss B.W., Wallace J.M.W., Bonham M.P. y Fearonn A.M. (2010). Read meat consumption: an overview of the risks and benefits. *Meat Science*, 84(1): 1-13.
- McCance y Widowson's *The composition of Foods*. (2015). The Royal Society of Chemistry. Cambridge, Inglaterra. Pp.: 1-252.
- McCarron D.A. y Heaney R.P. (2004) Estimated healthcare savings associated with adequate dairy food intake. *American Journal of Hypertension*, 17: 88-97.

Bibliografía

- Mekmene O., Le Graët Y. y Gaucheron F. (2009). A model for predicting salt equilibria in milk and mineral-enriched milks. *Food Chemistry*, 116: 233-239.
- Mendoza E., García M.L., Casas C. y Selgas M.D. (2001). Inulin as fat substitute in low fat, dry fermented sausages. *Meat Science*, 57: 387-393.
- Menrad K. (2003). Market and marketing of functional food in Europe. *Journal of Food Engineering*, 56: 181-188.
- Mensink G., Burger M., Beitz R., Henschel Y. y Hintzpeter B. (2002). Was essen wir heute? Ernährungsverhalten in Deutschland. Beiträge zur Gesundheitsberichterstattung des Bundes. Robert Koch-Institut. Berlin, Alemania. Pp.: 1-168.
- Mercasa (2014). Alimentación en España. Producción, industria, distribución, consumo. Carne y productos cárnicos. FSC. Madrid, España. Pp.: 194-226.
- Mesías M., Seiquer I. y Navarro M.P. (2009). Influence of diets rich in Maillard Reaction products on calcium bioavailability. Assays in male adolescents and in Caco-2 cells. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, 57: 9532-9538.
- Miale JB. (1992). Laboratory medicine: hematology. CV Mosby Company. St. Louis, USA. Pp.: 388-415.
- Midura R.J. y Hascall V.C. (1996). Bone sialoprotein—a mucin in disguise?. *Glycobiology*, 6 (7): 677-81.
- Mikelsen C. (1967). La ciencia de la Nutrición, Manuales Uteha. nº 347. México 1967.
- Miller DD., Schricker BR., Rasmussen RR. y Van Campen D. (1981). An in vitro method for estimation of iron bioavailability from meal. *American Journal of Clinical Nutrition*, 34: 2248-2256.
- Miller G.D., Jarvis J.K. y McBean L.D. (2001). The importance of meeting calcium needs with foods. *Journal of the American College of Nutrition*, 20(2): 168S-185S.
- Miller D.D. (2010). Minerales. En: Fennema química de los alimentos. (Ed.: S. Damodaran, K.L. Parkin y O.W. Fennema). Acribia. Zaragoza, España. Pp.: 521-570.
- Milner J. (2000). Functional foods: the US perspective. *American Journal of Clinical Nutrition*, 71: 1645S-1659S.
- Miquel E., Alegri A., Barbera R. y Farre R. (2006). Casein phosphopeptides released by simulated gastrointestinal digestion of infant formulas and their potential role in mineral binding. *International Dairy Journal*, 16: 992-1000.

Bibliografía

- Moghadasian MH. (2008). Advances in dietary enrichment with n-3 fatty acids. *Critical Review of Food Science and Nutrition*, 48(5):402-410.
- Moreiras O., Carbajal A., Cabrera L. y Cuadrado C. (2003). Tablas de Composición de alimentos. En: Tablas de Composición de alimentos: colección "ciencia y técnica". Pirámide. Humanes de Madrid, España. Pp.: 37-79.
- Moreno R. (2000). Minerales. En: Nutrición y dietética para tecnólogos de los alimentos. (Ed.: R. Moreno). Díaz de Santos. Madrid, España. Pp.: 91-96.
- Morrissey P.A. y Flynn, A. (1972). Bioavailability of minerals in milks. En: Milk and milk products in Human Nutrition. (Ed.: S.K. Kon). Food and Agriculture Organization of the United Nations. Nutritional Studies. Pp.: 1-80.
- Muguerza E., Gimeno O., Ansorena D. y Astiasarán I. (2004). New formulations for healthier dry fermented sausages: a review. *Trends in Food Science and Technology*, 15(9): 452-457.
- Nabryski M. (2002). Mineral components. En: Chemical and functional properties of food components. (Ed.: Zdzislaw E.) Technomic. Pensilvania, USA.
- Nair M.N., Sumana S.P., Li S., Ramanathanb R. y Mancini R.A. (2014). Temperature- and pH-dependent effect of lactate on in vitro redoxstability of red meat myoglobin. *Meat Science*, 96: 408-412.
- Navas-Acien A., Bleys J. y Guallar E. (2008). Selenium intake and cardiovascular risk: what is new?. *Current Opinions in Lipidology*, 19: 43-49.
- National Institute of Health. (2013). Calcium: Dietary Supplement Fact Sheet. Disponible en: <https://ods.od.nih.gov/factsheets/Calcium-HealthProfessional/#en1>. Última actualización 21 de noviembre 2013. (Acceso 17 Octubre 2015).
- National Osteoporosis Foundation (2008). Disponible en: <http://www.nof.org>. (Acceso 21 Septiembre 2015).
- Nelson E., Rogers R.R., Frantz J.A. y Ziegler E.E. (1996). Palm Olein in infant formula: absorption of fat and minerals by normal infants. *American Journal of Clinical Nutrition*, 64: 291-296.
- Nuevo-González J.A. (2009). Hipercalcemia como urgencia médica. *REEMO*, 18(3): 51-55.
- Oba S., Shimizy N., Nagata C., Shimizu H., Kametani M., Takeyama N., Ohnuma T. y Matsushita S. (2006). The relationship between the consumption of meat, fat, and

Bibliografía

- coffee and the risk of colon cancer: A prospective study in Japan. *Meat Science*, 244(2): 260-267.
- Ohta A, Ohtsuki M, Baba S, Takizawa T, Adachi T. y Kimura S. (1995). Effects of fructooligosaccharides on the absorption of iron, calcium and magnesium in iron-deficient anemic rats. *Journal of Nutrition Science*, 41(3): 281-291.
- Oliveira C., Sartini R. y Zagatto E. (2000). Microwave-assisted sample preparation in sequential injection: spectrophotometric determination of magnesium, calcium and iron in food. *Analytica Chimica Acta*, 413: 41-48.
- Olmedilla-Aonso B., Jiménez-Colmenero F. y Sánchez-Muniz F.J. (2013). Development and assessment of healthy properties of meat and meat products designed as functional foods. *Meat Science*, 95 (4): 919-930.
- Olmedilla-Alonso B. y Jiménez-Colmenero F. (2014). Alimentos cárnicos funcionales: desarrollo y evaluación de sus propiedades saludables. *Nutrición Hospitalaria*, 29(6): 1197-1209.
- OMS (Organización Mundial de la Salud) (2000). Prevention and management of osteoporosis: WHO scientific group. WHO technical report series, 921. Ginebra, Suiza. Pp.: 1-5.
- OMS (Organización Mundial de la Salud) (2009). Global Health risks: mortality and burden of disease attributable to selected major risks. World Health Organization. Ginebra, Suiza. Pp.: 32-54.
- Oomen A.G., Rompelberg C.J.M., Bruil M.A., Dobbe C.J.G., Pereboom D.P.K.H. y Sips A.J.A.M. (2003). Development of an *in vitro* digestion model for estimating the bioaccessibility of soil contaminants. *Archives of Environmental Contamination and Toxicology*. 44: 281-287.
- Orden 14 de Enero de 1986 por la que se aprueba la norma de calidad para carnes picadas de vacuno, ovino, porcino destinadas al mercado interior. (Boletín Oficial del Estado nº 18, 21 de Enero de 1986).
- Ordóñez J.A. (1998) Productos cárnicos. En: Tecnología de los alimentos. Vol II: Alimentos de origen animal. (Ed.: J.A. Ordóñez). Síntesis. Madrid, España. Pp.: 246-249.
- Ordóñez J.A., Hierro E.M., Bruna J.M. y de la Hoz L. (1999). Changes in the components of dry-fermented sausages during ripening. *Critical Review in Food Science and Nutrition*, 39: 329-267.

Bibliografía

- Ouwehand, A. (2007). Success in applying pro- and prebiotics in dairy products. In Proceedings of the fourth international FFNet meeting on functional foods. 26-27 de Marzo. Budapest, Hungría.
- Ozvural E. B. y Vural H. (2008). Utilization of interesterified oil blends in the production of frankfurters. *Meat Science*, 78(3): 211-216.
- Pakula C. y Stamminger R. (2012). Measuring changes in internal meat colour, colour lightness and colour opacity as predictors of cooking time. *Meat Science*, 90: 721-727.
- Palou A. y Serra F. (2000). Perspectivas europeas sobre alimentos funcionales. *Alimentación, Nutrición y Salud*, 7(13): 76-90.
- Pan Z. y Singh R.P. (2001). Physical and thermal properties of ground beef during cooking. *LWT-Food Science and Technology*, 34: 437-444.
- Parlamento Europeo (1990). Directiva 90/496/CEE del Consejo de 24 septiembre de 1990 relativa al etiquetado sobre propiedades nutritivas de los productos alimenticios. *Diario Oficial L 276*. 6 Octubre 1990.
- Parlamento Europeo (2006). Reglamento N° 1924/2006 del Parlamento Europeo y del Consejo del 20 de Diciembre 2006, relativo a las declaraciones nutricionales y de propiedades saludables de los alimentos. *Diario Oficial de la Unión Europea L 404/9*. 30 Diciembre 2006.
- Parlamento Europeo (2006). Reglamento N° 1907/2006 del Parlamento Europeo y del Consejo del 18 de Diciembre 2006, relativo al registro, la evaluación, la autorización y la restricción de sustancias y preparados químicos (REACH), por el que se crea la Agencia Europea de Sustancias y Preparados Químicos, se modifica la Directiva 1999/45 (CE) y se deroga el Reglamento (CEE) N° 793/93 del Consejo y el Reglamento N° 1488/94 de la Comisión así como la Directiva 76/769 CEE del Consejo y las Directivas 91/155/CEE, 83/67/CEE, 93/105/CE y 2000/21/CE de la Comisión. *Diario Oficial de la Unión Europea L 136/3*. 29 Mayo 2007.
- Parlamento Europeo (2008). Directiva 2008/100/EC de la Comisión de 28 de Octubre 2008, por la que se modifica la Directiva 90/496/CEE del Consejo, relativa al etiquetado sobre propiedades nutritivas de los productos alimenticios, en lo que respecta a las cantidades diarias recomendadas, los factores de conversión de energía y las definiciones. *Diario Oficial de la Unión Europea L285/9-12*. 29 Octubre 2008.

Bibliografía

- Parlamento Europeo (2012). Reglamento N° 432/2012 de la Comisión del 16 de mayo de 2012 por el que se establece una lista de declaraciones autorizadas de propiedades saludables de los alimentos, distintas de las relativas a la reducción del riesgo de enfermedad y al desarrollo y salud de los niños. Diario Oficial de la Unión Europea L136/140. 16 Mayo 2012.
- Parlamento Europeo (2012). Reglamento N° 1047/2012 de la Comisión del 8 de noviembre de 2012 por el que se modifica el Reglamento N° 1924/2006 del Parlamento Europeo en lo relativo a la lista de declaraciones nutricionales. Diario Oficial de la Unión Europea L310/36-37. 9 Noviembre 2012.
- Parlamento Europeo (2013). Reglamento N° 536/2013 de la Comisión del 11 de junio de 2013 por el que se modifica el Reglamento N° 432/2012, por el que se establece una lista de declaraciones autorizadas de propiedades saludables de los alimentos distintas de las relativas a la reducción del riesgo de enfermedad y al desarrollo y la salud de los niños. Diario Oficial de la Unión Europea L160/4-8. 12 Junio 2013.
- Pathomrungsriyounggul P., Lewis M.J. Y Grandison A.S. (2010). Effects of calcium-chelating agents and pasteurisation on certain properties of calcium-fortified soy milk. *Food Chemistry*, 118: 808-814.
- Peacock M. (2010). Calcium metabolism in health and disease. *Clinical Journal of the American Society of Nephrology*, 5: S23-S30.
- Pedrero D.L. y Pangborn R.M. (1989). Métodos analíticos. En: Evaluación sensorial de los alimentos. (Ed.: D.L. Pedrero y R.M. Pangborn). Alambra Mexicana. Madrid, España. Pp.: 67-107.
- Perales S., Barberá R., Lagarda MJ. y Farré R. (2005). Bioavailability of calcium from milk- based formulas and fruit juices containing milk and cereals estimated by in vitro methods (solubility, dializability and uptake and transport by Caco-2 cells). *Journal of Agriculture and Food Chemistry*, 53: 3721-3726.
- Pérez-Elortondo F.J. (2000). Ensayos hedónicos. En: Análisis sensorial de alimentos. Métodos y aplicaciones. (Ed.: Ibáñez F.C. y Barcina Y.). Springer-Verlag Ibérica. Barcelona, España. Pp.: 90-110.
- Philippe M., Gaucheron F., Le Graet Y., Michel F. y Garem A. (2003). Physicochemical characterization of calcium-supplemented skim milk. *Lait*, 83: 45-59.
- Plaismast H., Sirichadwal P.P., Puwastien P., Judprasong K. y Wasantwisut E. (2009). *In vitro* bioaccessibility of intrinsically zinc-enriched egg and effect of cooking. *Journal of Food Composition and Analysis*, 22 (7-8): 627-631.

Bibliografía

- Poulanne E. y Halonen M. (2010). Theoretical aspects of water-holding in meat. *Meat Science*. *Meat Science*, 86: 151-165.
- Prasad A. (1985). Clinical manifestations of zinc deficiency. *Annual Review of Nutrition*, 5: 341-363.
- Quílez J., Magda R., Brufau G., García-Lorda P., Megías I., Bulló M., Ruiz JA. y Salas-Salvadó J. (2003). Bakery products enriched with phytosterol esters, α -tocopherol and β -carotene decrease plasma LDL-cholesterol and maintain plasma β -carotene concentrations in normocholesterolemic men and women. *The Journal of Nutrition*, 133(10): 3103-3109.
- Rachner R., Khosla S. y Hofbaver C. (2011). Osteoporosis: now and the future. *New Horizons*, 377: 1276-128
- Raimondi S., Roncaglia L., De Lucía M., Amaretti A., Leonardi A., Pagnoni U. y Rossi M. (2009). Bioconversion of soy isoflavones daidzin and daidzein by *Bifidobacterium* strains. *Applied Microbiology and Biotechnology*, 81:943-950.
- Ralph A. y McArdle H (2001). Copper metabolism and requirements in the pregnant mother, her fetus, and children. *International Copper Association*. Nueva York, USA.
- Raul F., Keding M., Simon P., Grenier J. y Haffen K. (1978). Behaviour of isolated rat intestinal cells maintained in suspension or monolayer cultures. *Biology of the Cell*, 33: 163-168.
- Rayssiguier Y., Guezennec C.Y. y Duralach J. (1990). New experimental and clinical data on the relationship between magnesium and sport. *Magnesium Research: official organ of the International Society for the Development of Research on Magnesium*, 3(2):93-102.
- Real Decreto N° 830/1992 de 17 de Julio, por el que se aprueba la norma de etiquetado sobre propiedades nutritivas de los productos alimenticios. BOE n° 187 de 5 Agosto de 1992. Pp.: 27381-27383.
- Real Decreto N° 1669/2009 de 6 de Noviembre por el que se modifica la norma de etiquetado sobre propiedades nutritivas de los productos alimenticios, aprobada por el Real Decreto 930/1992, de 17 de julio. BOE n° 269 de 7 Noviembre 2009. Pp.: 92956-92959.
- Real Decreto N° 1487/2009 de 26 de septiembre de 2009, relativo a los componentes alimenticios. BOEA-2009-16109. BOE n° 244 de 9 Octubre 2009. Pp.: 85370-85378.

Bibliografía

- Real Decreto N° 135/2010 de 12 de febrero de 2010, por el que se derogan disposiciones relativas a los criterios microbiológicos de los productos alimenticios. BOE n° 49 de 25 Febreo 2010. Pp.: 18297-18299.
- Real Decreto N° 1047/2012 de 8 de noviembre de 2012, por el que se modifica el Reglamento (CE) 1924/2006 en lo relativo a la lista de declaraciones nutricionales. BOE n° 312 de 30 Diciembre 2013. Pp.: 106563-106593.
- Recker R.R., Bammi M.S., Barger-Lus M.J. y Heany R.P. (1988). Calcium absorbability from milk products, and imitation milk and calcium carbonate. *Amercian Journal of Clinical Nutrition*, 47: 93-95.
- Regand A. y Goff H.D. (2003). Structure and ice recrystallisation in frozen stabilised ice cream model systems. *Food Hydrocolloids*, 17: 95-102.
- Reyes-Gavilán C.G., Fernández M., Hudson J.A. y Korpela R. (2015). Role of microorganisms present in dairy fermented products in health and disease. *Biomed Research Internationl*, Article ID 204173. Disponible en: <http://dx.doi.org/10.1155/2015/204173>. (Acceso 27 Octubre 2015).
- Ribnicky D.M., Roopchanda D.E., Oren A., Grace M., Pouleva AL., Lila M.A., Havenaar R. y Raskina I. (2014). Effects of a high fat meal matrix and protein complexation on the bioaccessibility of blueberry anthocyanins using the TNO gastrointestinal model (TIM-1). *Food Cheminal*, 142: 349-357.
- Ricondo Z. y Ayo J. (2007). Tomato fibre as a new source of functional fibre for a meat application type sausage. *Developments in science & health claims*, ILSI international symposium on functional foods in Europe. 9-11 Mayo. Malta.
- Roberfroid M. B. (2000). An European consensus of scientific concepts of functional foods. *Nutrition*, 16: 689-691.
- Roberfroid M. y Slavin J. (2000). Non digestible Oligosaccharides. *Critical Reviews in Food Science and Nutrition*, 40(6): 461-480.
- Roberfroid M.B. (2002). Global view on functional foods: European pespectives. *British Journal of Nutrition*, 88(2): S133-S138.
- Romeo J., Wärnberg J., García-Mármol E., Rodríguez-Rodríguez M., Diaz L.E., Gómez-Martínez S. Cueto B., López-Huertas E., Cepero M., Boza J.J., Fonollá J. y Marcos A. (2011). Daily consumption of milk enriched with fish oil, oleic acid, minerals and vitamins reduces cell adhesion molecules in healthy children. *Nutrition, Metabolism and Cardiovascular Diseases*, 21(2): 113-120.

Bibliografía

- Rovira R.F. y Pons I.F. (1999). Calcio, fósforo y magnesio. En: Tratado de Nutrición. (Ed.: M. Hernández y A. Sastre). Díaz de Santos. Madrid, España. Pp.: 217-229.
- Rule A.D., Krambeck A.E. y Lieske J.C. (2011). Chronic kidney disease in kidney stone formers. *Clinical Journal of the American Society of Nephrology*, 6: 2069-2075.
- Ruusunen M. y Puolanne E. (2005). Reducing sodium intake from meat products. *Meat Science*, 70: 531-541.
- Ruz M., Codocero J., Inostroza J., Rebolledo A., Krebs N., Westcott J., Sian L. y Hambidge M. (2005). Zinc absorption from a micronutrient-fortified dried cow's milk used in the Chilean National Complementary Food Program, 25(12): 1043-1048.
- Saher M., Arvola A., Lindeman M. y Lähteenmäki L. (2004). Impressions of functional food consumers. *Appetite*, 42: 79-89.
- Salazar P., García M.L. y Selgas M.D. (2009). Short-chain fructooligosaccharides as potential functional ingredient in dry fermented sausages with different fat levels. *International Journal Food Science and Technology*, 44: 1100-1107.
- Sambuy Y., De Angelis I., Ranaldi G., Scarino M.L., Stamatii A. y Zucco F. (2005). The Caco-2 cell line as a model of the intestinal barrier: influence of cell and culture-related factors on Caco-2 cell functional characteristics. *Cell Biology and Toxicology*, 21: 1-26.
- Sánchez-Alonso I., Haji-Maleki R. Y Borderías J. (2007). Wheat fiber as a functional ingredient in restructured fish products. *Food Chemistry*, 100 (3): 1037-1043.
- Sánchez de Median Contreras F. (2010). Metabolismo de los aminoácidos. En : Bases Fisiológicas y Bioquímicas de la nutrición. (Ed.: A. Gil). Panamericana. Buenos Aires, Argentina. Pp.: 321-344.
- Sarria B. (1998). Efectos del tratamiento térmico de formulas infantiles y leche de vaca sobre la biodisponibilidad mineral y proteica. Tesis Doctoral. Instituto de Nutrición y Bromatología. Centro mixto CSIC-UCM. Facultad de Biológicas. Universidad Complutense de Madrid.
- Sastre Gallego A. (2005). La aventura científica de la Nutrición. *Alimentaria y Nutrición de la Salud*. vol. 7 (4), 20: 111-117
- Savadkoochi S., Hoogenkamp H., Shamsi K. y Farahnaky A. (2014). Color, sensory and textural attributes of beef frankfurter, beef ham and meat-free sausage containing tomato pomace. *Meat Science*, 97: 410-418.

Bibliografía

- SCF (Scientific Committee on Food) (2003). Minutes'' statement of the Scientific Committee on Food addressing the limitations of extrapolating tolerable upper intake levels of nutrients for children (adopted on 4 April). SCF/CS/NUT/IF/65 Final. Annex XIV , Minutes of the 137th Plenary Meeting of the Scientific Committee on Food held on 2-4 April 2003 in Brussels. SCF/CS/PLEN/MINS 137 (14 May). Disponible en: http://ec.europa.eu/food/safety/docs/labelling_nutrition-special_groups_food-children-out199_en.pdf. (Acceso 27 Octubre 2015).
- Schaafsma A., Vries P.J.F. and Saris W.H.M. (2001). Dealy of natural bone loss by higher intakes of specific minerals and vitamins. *Critical Reviews in Food Science and Nutrition*, 41(3): 225-249.
- Scholz-Ahrens K., Schaafsma G, van der Heuvel E. y Schrezenmeir J. (2001). Effects of prebiotics on mineral metabolism. *American Journal of Clinical and Nutrition*, 73: S459-S464.
- Scholz-Ahrens K. y Schrezenmeir J. (2002). Inulin, oligofructose and mineral metabolism. Experimental data and mechanisms. *British Journal of Nutrition*, 87: S179-S186.
- Scholz-Ahrens K.E., Ade P., Marten B., Weber P., Timm W., Aşil Y., Gluter C. y Schrezenmeir J. (2007). Prebiotics, Probiotics, and Symbiotics Affect Mineral Absorption, Bone Mineral Content, and Bone Structure. *The Journal of Nutrition*, 37: 838S-846S.
- Schreiber WE. (1999). Iron, porphyrin, and bilirubin metabolism. En: *Clinical chemistry: theory, analysis, and correlation*. (Ed.: L.A. Kaplan y A.J. Pesce). CV Mosby. St. Louis, USA. Pp.: 496-511.
- Schumann K., Classen H.G., Hages M., Prinz-Langenhöl Rl, Pietrzik K. y Biesalski H.K. (1997). Bioavailability of oral vitamins, minerals and trace elements in perspective. *Drug Research*, 47: 369-380.
- Seeling M. (1989). Magnesium Deficiency in the Pathogenesis of Disease: Early Roots of Cardiovascular, Skeletal and Renal Abnormalities. Plenum Medical Books. Nueva York, USA. Pp.: 1-488.
- Selgas M.D. y García M.L. (2008). Meat products enriched with calcium. En: *Technological strategies for functional meat products development*. (Ed.: J. Fernández y J.A. Peérez). Transworld Research Network. Kerala, India. Pp.: 57-85.

Bibliografía

- Selgas M.D., García M.L. y Calvo M.M. (2009^a). Effect of irradiation and storage on the physic-chemical and sensory properties of hamburgers enriched with lycopene. *International Journal of Food Science and Technology*, 44: 1983-1989.
- Selgas M.D., Salazar P. y García M.L. (2009^b). Usefulness of calcium lactate, citrate and gluconate for calcium enrichment of dry fermented sausages. *Meat Science*, 82: 478-480.
- Shah N.P. (2001). Textural, water holding and sensory properties of low-fat pork bologna with normal or waxy starch hull less barley. *Journal of Food Science*, 65(1): 101-107.
- Shariff R., Thomas P., Zalewski P. y Fenech M. (2012). The role of zinc in genomic stability. *Mutation Research/Fundamental and Molecular Mechanisms of Mutagenesis*, 733 (1-2): 111-121.
- Shen L., Robberecht H., Van Deal P. y Deelstra H. (1995). Estimation of the bioavailability of zinc and calcium from human, cow's, goat and sheep milk by an *in vitro* method. *Biological Trace Element Research*, 49: 107-118.
- Sherwood L. (2010). The blood. En: *Human Physiology* 17 ed. (Ed.: Oliveira L.). Brooce Cool. Belmont, Estados Unidos. Pp.: 391-417.
- Shiowatana J., Kitthikhun W., Sottimai U., Promchan J. y Kunajiraporn K. (2006). Dynamic continuous-flow dialysis method to simulate intestinal digestion for *in vitro* estimation of mineral bioavailability of food. *Talanta*, 68: 549-557.
- Side C. (2006). Overview on marketing functional foods in Europe. Functional food network general meeting. 8-10 Marzo. Turku, Finlandia.
- Simpson P., Challissand R. y Nahorski S. (1995). Neuronal Ca² stores: activation and function. *Trends Neuroscience*, 18: 299-306.
- Singh G. y Muthukumarappan K. (2008). Influence of calcium fortification on sensory, physical and rheological characteristics of fruit yogurt. *LWT - Food Science and Technology*, 41(7): 1145-1152.
- Singh G., Arora S., Sharma G.S., Sindhu J.S., Kansal V.K. y Sangwan R.B. (2007). Heat stability and calcium bioavailability of calcium-fortified milk. *LWT - Food Science and Technology*, 40: 625-631.
- Siró I., Kapolna E., Kapolna B. y Lugasi A. (2008). Functional food. Product development, marketing and consumer acceptance—A review. *Appetite*, 51: 456-467.

- Sittikulwitit S., Sirichakwal P., Puwastien P., Chavasit V. y Sungpuag P. (2004). In vitro bioavailability of calcium from chicken bone extract powder and its fortified products. *Journal of Food Composition and Analysis*, 17 (3-4): 321-329.
- Smetanová L., Stetinová V., Svoboda Z. y Kvetina J. (2011). Caco-2 cells, biopharmaceutics classification system (BCS) and biowaiver. (2011) *Acta Medica (Hradec Králové)*, 54(1):3-8
- Sørheim O., Westad F., Larsen H., Alvseike O. (2009). Colour of ground beef as influenced by raw materials, addition of sodium chloride and low oxygen packaging. *Meat Science*, 81: 467-473.
- Soriano del Castillo J.M., (2006). Conceptos y evolución histórica de la Nutrición humana. En: *Nutrición básica humana*. Ed. Universidad Politécnica de Valencia. Pp.: 23-29.
- Stanton C., Ross R. P., Fitzgerald G. F. y Van Sinderen D. (2005). Fermented functional foods based on probiotics and their biogenic metabolites. *Current Opinion in Biotechnology*, 16, 198-203.
- Stathopoulou M.B., Kanoni S., Papanikolaou G., Antonopoulou S., Nomikos R. y Dedoussis G. (2012). Mineral Intake. *Progress in Molecular Biology and Translational Science*, 108: 201-236.
- Stollewerk K., Jofré A., Comaposada J., Ferrini G. y Garriga M. (2011). Food safety in fast drying (QDS process®) of dry-cured meat products: high pressure and NaCl-free processing implementation. Tesis doctoral. IRTA y Universidad de Girona.
- Straub D. (2007). Calcium supplementation in clinical practice: a review of forms, doses and indications. *Nutrition in Clinical Practice*, 22(3): 286-296.
- Suttle N. (2010). The mineral nutrition of livestock. 4º Edición. (Ed.: Suttle N.). Technology and Engineering. Cambridge, USA. Pp.: 1-587.
- Takei K., Stukenbrok H., Metcalf A., Mignery G.A., Südhof T.C., Volpe P. y De Camilli P. (1992). Ca^{2+} stores in Purkinje neurons: endoplasmic reticulum subcompartments demonstrated by the heterogeneous distribution of the InsP3 receptor, Ca^{2+} -ATPase, and calsequestrin. *Journal of Neuroscience*, 12 (2): 489-505.
- Tang A.L., Shah N., Wilcox G. y Stojanovska L. (2007). Fermentation of calcium-fortified soymilk with *Lactobacillus*: Effects on calcium solubility, isoflavone conversion and production of organic acids. *Journal of Food Science*, 72(9): M431-M436.

Bibliografía

- Taylor J.B., Marchello M.J., Finley J.W., Neville T.L., Combs G.F. y Caton J.S. (2008). Nutritive value and display-life attributes of selenium-enriched beef-muscle foods. *Journal of Food Composition and Analysis*, 21(2): 183-186.
- Teucher B., Majsak-Newman G., Dainty J.R., McDonagh D., FitzGerald R.J. y Fairweather-Tait S.J. (2006). Calcium absorption is not increased by caseinophosphopeptides. *The American Journal of Clinical Nutrition*, 84(1): 162-6.
- Thornberg E. (2005). Effects of heat on meat proteins. Implications on structure and quality of meat products. *Meat Science*, 70: 493.
- Toldrá F. y Reig M. (2011). Innovations for healthier processed meats. *Trends in Food Science and Technology*, 22: 517-522.
- Tolonen M. (1990). Minerals and trace elements. En: *Vitamins and minerals in health and nutrition*. (Ed.: C. Alais y G. Linden). Ellis Horwood Series in Food Science and Technology. Londres, Inglaterra. Pp.: 148-197.
- Turlund J.R. (1998). Human whole-body copper metabolism. *The American Journal of Clinical Nutrition*, 67(5): 960S-964S.
- Underwood E. (1981). *The mineral nutrition of livestock*. 4º Edición. (Ed.: Suttle N.). Technology and Engineering. Cambridge, USA. Pp.: 1-39.
- Unruh von G. E., Voss S., Sauerbruch T. y Hesse A. (2004). Dependence of oxalate absorption on the daily calcium intake. *Journal of the American Society of Nephrology*, 15: 1567-1573.
- Urso R., Comi G. y Cocolin L. (2006). Ecology of lactic acid bacteria in Italian fermented sausages: isolation, identification and molecular characterization. *Systematic and Applied Microbiology*, 29: 671-680.
- Vaisberg E., Lenzi D., Hansen R., Keon B. y Finer J. (2006). An infrastructure for high-throughput microscopy: instrumentation, informatics, and integration. *Methods Enzymol*, 414: 484-512.
- Valenzuela B., Martín-Villodre A. y Nácher A. (2003). Estudio de la permeabilidad del salbutamol en células Caco-2: clon TC7. VI Congreso de la Sociedad Española de Farmacia Industrial y Galénica (SEFIG) 3ª Jornadas de Tecnología Farmacéutica (AEFI). Granada, Ed. Comares, S.L. Disponible en: <http://www.sefig.org/doc/Granada2003.htm>. (Acceso: 27 Octubre 2015).
- Van der Hee R., Miret S., Slettenaar M., Duchateau S.M.J.G., Rietveld A.G., Wilkinson J.E., Quail P.J., Berry M.J., Dainty J.R., Teucher B. y Fairweather-Tait S.J. (2009).

Bibliografía

- Calcium absorption from fortified ice cream formulations compared with calcium absorption from milk. *Journal of American Dietetic Association*, 109: 830-835.
- Van Het Hof KH, West CE, Weststrate JA, Hautvast JG. (2000). Dietary factors that affect the bioavailability of carotenoids. *Journal of Nutrition*, 130(3):503-506.
- Vasudevan D.M., Sreekumari S. y Vaidyanathan K. (2011). Thyroid Hormones. En: *Textbook of biochemistry for medical students*. Jaypee Brothers Medical Publishers (P) Ltd. Nueva Delhi, India. Pp.: 538-543.
- Vaughan EE., de Vries MC., Zoetendal EG., de Vos WM. y Akkermans ADL. (2002). A molecular view of the intestinal ecosystem. *Current Issues of Intestinal Microbiology*, 1: 1-12.
- Venema K., Havenaar R. y Minekus M. (2009). Improving in vitro simulation of the stomach and intestines. En: *Designing functional foods. Measuring and controlling food structure breakdown and nutrient absorption*. (Ed.: J. Mc. Clements y E. Decker). CRC and Woodhead Publishing Limited. Tonbridge, Inglaterra. Pp.: 314-339).
- Viadel M.B. (2002). Biodisponibilidad de calcio, hierro y cinc en leguminosas mediante ensayos in vitro con cultivos celulares. Tesis doctoral. Facultad de Farmacia. Universidad de Valencia.
- Vincent JB. (2000). The biochemistry of chromium. *Journal of Nutrition*, 130:715.
- Vidal C. (2006). El calcio en la dieta diaria. *Yogur vivo: alimentos funcionales*, 22: 4-7.
- Viuda M., Ruiz Y., Fernández J. y Pérez J.A. (2010). Effect of added citrus fibre and spice essential oils on quality characteristics and shelf-life of mortadella. *Meat Science*, 85, 568-576.
- Weaver C. y Heany R. (1991). Isotopic Exchange of Ingested Calcium Between Labeled Sources. Evidence that Ingested Calcium Does Not Form a Common Absorptive Pool. *Calcified Tissue International*, 49: 244-247.
- Weiss J., Gibis M., Schuh V. and Salminen H. (2010). Advances in ingredient and processing systems for meat and meat products. *Meat Science*, 86: 196-213.
- Wilson G., Hassan I.F., Dix D.J., Williamson I., Shah R., Mackey M. y Artursson P. (1990). Transport and permeability properties of human Caco-2 cells: An in vitro model of the intestinal epithelial cell barrier. *Journal of Controlled Release*, 11: 25-40.

Bibliografía

- Wolfgor R., Drago S.R., Rodríguez V., Pellegrino N. y Valencia M. (2002). *In vitro* measurement of available iron in fortified foods. Food Research International, 35: 85-90.
- Yang H.S., Choi S.G., Jeon J.T., Park G-B y Joo S-T. (2007). Textural and sensory properties of low fat pork sausages with added hydrated oatmeal and tofu as texture-modifying agents. Meat Science, 75: 283-289.
- Yassimi A., Hichami A., Besnard P. y Khan N.A. (2008). Lionelic acid induces calcium signaling, Src Kinase phosphorylation, and neurotransmitter release in Mouse CD 36-positive gustatory cells. The Journal of Biological Chemistry, 283 (19): 12949-12959.
- Yoshida Y., Kiso M. y Goto T. (1999). Efficiency of the extraction of catechins from green tea. Food Chemistry, 67: 429-433.
- Xia J., Weaver A., Gerrard D. y Yao G. (2008). Heating induced optical property changes in beef muscle. Journal of Food Engineering, 84: 75-81.
- Zhang W., Xiao S., Samaraweera H., Lee E.J. y Ahn D.U. (2010). Improving functional value of meat products. Meat Science, 86: 15-31.
- Zemel, B. M. (2001). Calcium modulation of hypertension and obesity: Mechanisms and implications. Journal of the American College of Nutrition, 20: 428S-435S.